

# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Oncologia Médica

### **Análise genética do perfil tumoral como fator adicional na abordagem ao doente oncológico: estudo de caso**

Cláudia Melissa de Paiva Agostinho

---

**Junho'2019**



# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Oncologia Médica

### **Análise genética do perfil tumoral como fator adicional na abordagem ao doente oncológico: estudo de caso**

Cláudia Melissa de Paiva Agostinho

**Orientado por:**

Dra. Maria Rita Dionísio Vieira da Cruz Pereira Maranhas  
Abreu

---

**Junho'2019**

## Resumo

As doenças oncológicas são muito prevalentes e o cancro da mama é a neoplasia mais frequente e de maior mortalidade na mulher.

A compreensão dos processos moleculares e das alterações genéticas subjacentes às neoplasias, permite o desenvolvimento de terapêuticas específicas, que podem alterar a abordagem terapêutica dos doentes. O *Comprehensive Genetic Profiling* realizado através da sequenciação genética de nova geração utilizada pela *FoundationOne® CDx* é uma das formas de termos acesso a alterações genéticas tumorais clinicamente significativas.

Estas alterações genéticas e moleculares podem evoluir ao longo da progressão da doença e por vezes serem responsáveis pelo surgimento de mecanismos de resistência à terapêutica.

O estudo do caso apresentado ilustra a heterogeneidade e a capacidade evolutiva das células tumorais e permite-nos analisar de que forma o conhecimento das mutações presentes nas células tumorais pode modificar a nossa abordagem terapêutica.

Neste caso, a evolução da doença fez-nos perceber que, apesar dos marcadores avaliados por imunohistoquímica ou hibridização *in situ* nos direcionarem para uma terapêutica preferencial, existem outras alterações (detetadas com a análise genética) que predizem diferentes respostas a uma mesma terapêutica. Assim sendo, no caso apresentado, a análise genética permitiu perceber a razão pela qual o tumor se mantinha resistente e com capacidade de provocar progressão da doença, apesar da terapêutica dirigida ao *human epidermal growth factor receptor 2* (HER-2).

No caso apresentado detetou-se uma mutação onde seria possível atuar e esta descoberta alterou a abordagem terapêutica deste caso em particular. No entanto, não foi possível concluir se esta alteração na terapêutica se refletiu numa alteração do curso da doença e numa melhoria dos *outcomes*.

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML.

## Abstract

Oncologic diseases are very prevalent and breast cancer is, among women, one of the most frequent cancers and with most mortality.

The understanding of molecular processes and genetic changes related to cancer allows the development of specific therapeutics, which can change the therapeutic approach to patients. One way to have access to clinically significant tumoral genetic changes is by performing a Comprehensive Genetic Profiling carried through Next Generation Sequencing (a method used by *FoundationOne*<sup>®</sup> *CDx*).

These genetic and molecular changes can evolve with the disease progress and are sometimes responsible for the emergence of mechanisms resistant to therapy.

The study case shows the heterogeneity and the evolutionary capacity of tumoral cells and allows us to analyse in which way the knowledge of mutations within tumoral cells may affect our therapeutic approach.

In this case, the disease evolution made us understand that, despite the markers evaluated by immunohistochemistry or in situ hybridization lead us to a preferential therapy, there are other alterations (detected with genetic analysis) which predict different reactions to the same therapy. Therefore, in the presented case, the genetic analysis enabled us to comprehend the reason why the tumour remains resistant and capable of inducing the disease progression, despite of the *human epidermal growth factor receptor 2* (HER-2) directed therapy.

In this case, it was possible to detect a mutation where we could potentially act and this discovery changed the therapeutic approach of this case in particular. However, it was not possible to conclude if this therapeutic change was reflected in a modification of the disease course and an improvement of the outcomes.

The Final Paper expresses the opinion of the author and not of the FML.

## Palavras Chave / *Keywords*

Cancro da Mama – *Breast Cancer*;

*Comprehensive Genetic Profiling*;

*Foundation Medicine*<sup>®</sup>;

Sequenciação genética de nova geração - *Next-Generation Sequencing*.

## Índice

Resumo .....	2
<i>Abstract</i> .....	3
Palavras Chave / <i>Keywords</i> .....	4
Índice de figuras .....	6
Introdução .....	9
Epidemiologia da Doença Oncológica.....	9
Desafios atuais na oncologia.....	11
Importância deste trabalho e impacto .....	12
<i>Comprehensive Genetic Profiling</i> .....	12
Sequenciação genética de nova geração .....	15
Limitações da sequenciação de nova geração .....	16
Utilização do DNA livre .....	17
<i>Foundation Medicine</i> ® .....	21
<i>FoudationOne</i> ® <i>CDx</i> .....	22
<i>FoundationOne</i> ® <i>Liquid</i> .....	24
Cancro da mama .....	24
Subtipos moleculares.....	26
Terapêuticas .....	28
Generalidades sobre o HER-2.....	30
Mecanismos de resistência aos bloqueadores do domínio extracelular do HER-2. 31	
Caso clínico .....	37
Discussão .....	45
Conclusão.....	49
Agradecimentos .....	50
Bibliografia.....	51

## Índice de figuras

Figura 1 - Linha temporal com a representação das recidivas ao longo do decurso da doença e respetiva caracterização anatomo-patológica. Fonte: elaborado pela autora. (2019). .....	43
Figura 2 - Linha temporal da abordagem terapêutica farmacológica da doente durante o decurso da doença. Fonte: elaborado pela autora. (2019). .....	44
Figura 3 - Incidência estimada das neoplasias mais frequentes, em 2018, no mundo, em ambos os sexos e para todas as idades. Fonte: Global Cancer Observatory. (2018) (3). 54	
Figura 4 - Incidência estimada das neoplasias mais frequentes, em 2018, no mundo, no sexo masculino e em todas as idades. Fonte: Global Cancer Observatory. (2018) (3). . 55	
Figura 5 - Incidência estimada das neoplasias mais frequentes, em 2018, no mundo, no sexo feminino e em todas as idades. Fonte: Global Cancer Observatory. (2018) (3). ... 56	
Figura 6 - Mortalidade em números absolutos estimada das neoplasias mais frequentes, em 2018, no mundo, em ambos os sexos e para todas as idades. Fonte: Global Cancer Observatory. (2018) (3). .....	57
Figura 7 - Mortalidade em números absolutos estimada das neoplasias mais frequentes, em 2018, no mundo, no sexo masculino em todas as idades. Fonte: Global Cancer Observatory. (2018) (3). .....	58
Figura 8 - Mortalidade em números absolutos estimada das neoplasias mais frequentes, em 2018, no mundo, no sexo feminino em todas as idades. Fonte: Global Cancer Observatory. (2018) (3). .....	59
Figura 9 - Incidência e mortalidade estimadas, em números absolutos, das neoplasias mais frequentes, em 2018, no mundo, em ambos os sexos e para todas as idades. Fonte: Global Cancer Observatory. (2018) (3). .....	60
Figura 10 - Incidência e mortalidade estimadas, em números absolutos, das neoplasias mais frequentes, em 2018, no mundo, no sexo masculino em todas as idades. Fonte: Global Cancer Observatory. (2018) (3). .....	61
Figura 11 - Incidência e mortalidade estimadas, em números absolutos, das neoplasias mais frequentes, em 2018, no mundo, no sexo feminino em todas as idades. Fonte: Global Cancer Observatory. (2018) (3). .....	62
Figura 12 - Alterações genéticas detetáveis no cfDNA tumoral. As células tumorais libertam pequenos fragmentos de DNA livre de células para a circulação por múltiplos mecanismos. As alterações genéticas associadas ao cancro, como as mutações pontuais,	



alteração no número de cópias, rearranjos cromossômicos e padrões de metilação podem ser detetados no cfDNA. Fonte: Diaz LA, Bardelli A. (2014) (11). .....	63
Figura 13 - Indicações terapêuticas segundo o biomarcador detetado. Fonte: Foundation Medicine®. (2018) (14).....	64
Figura 14 - Genes com regiões exônicas de codificação completa incluídas no <i>FoundationOne</i> ® CDx para a detecção de substituições, inserções, deleções e alterações no número de cópias. Fonte: Foundation Medicine®. (2018) (14). .....	65
Figura 15 - Genes com regiões intraiônicas incluídas no <i>FoundationOne</i> ® CDx, selecionadas para a detecção de rearranjos gênicos, um gene com uma região promotora e um gene de RNA não-codificante. Fonte: Foundation Medicine®. (2018) (14).....	66
Figura 16 - Genes com sequenciação completa pesquisados no <i>FoundationOne</i> ® Liquid (substituição de bases, inserções, deleções e alterações no número de cópias). Fonte: Foundation Medicine®. (2018) (14). .....	67
Figura 17 - Exões selecionados pesquisados no <i>FoundationOne</i> ® Liquid. Fonte: Foundation Medicine®. (2018) (14). .....	68
Figura 18 - Rearranjos selecionados pesquisados no <i>FoundationOne</i> ® Liquid. Fonte: Foundation Medicine®. (2018) (14). .....	69
Figura 19 – Linha do tempo que mostra as opções terapêuticas de terapêutica alvo aprovadas pela FDA para o tratamento do cancro da mama HER-2 positivo. Fonte: Gagliato DDM, Leonardo D, Jardim F, Pereira MS, Hortobagyi GN. (2016) (20). .....	70
Figura 20 - Algoritmo do tratamento do cancro da mama em estadio inicial, adaptado de <i>ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up</i> . HT, hormonoterapia; QT, quimioterapia; RT, radioterapia. Fonte: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. (2015) (7). .....	71
Figura 21 - Algoritmo da terapêutica (neo)adjuvante sistémica adequada a cada subtipo tumoral (direcionada pela expressão de biomarcadores específicos e fenótipo intrínseco). Adaptado de <i>ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up</i> . HER-2, human epidermal growth factor receptor 2; HT, hormonoterapia; QT, quimioterapia; RE, recetores dos estrogénios; RP, Recetores da progesterona; RT, radioterapia; T, Trastuzumab. Fonte: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. (2015) (7). .....	72
Figura 22 – Mecanismos de resistência ao Trastuzumab. (1) <i>Steric effects</i> . A p95HER2 que não possui o domínio extracelular, de ligação ao Trastuzumab é uma proteína truncada que fica constitutivamente ativa; (2) Sobreexpressão de outros recetores tirosina-cinase. A sobreexpressão destes recetores pode originar os mesmos efeitos a nível celular, embora a sinalização do HER-2 seja inibida; (3) Alterações intracelulares	

na sinalização a jusante do HER-2. Estas alterações podem promover a ativação constitutiva da via PI3K/AKT. Fonte: Vu T, Claret FX. (2012) (18). ..... 73

Figura 23 - Lista de estudos possíveis utilizando os filtros *HER-2 positive, recruiting studies, interventional studies, breast cancer stage IV, studies with female participants e 40 years*. Fonte: ClinicalTrials.gov. (2019) (22). ..... 74

Figura 24 - Lista de estudos possíveis utilizando os filtros *p53, recruiting studies, interventional studies, breast cancer stage IV, studies with female participants e 40 years*. Fonte: ClinicalTrials.gov. (2019) (22). ..... 75

Figura 25 - Lista de estudos possíveis utilizando os filtros *PI3K, recruiting studies, interventional studies, breast cancer stage IV, studies with female participants e 40 years*. Fonte: ClinicalTrials.gov. (2019) (22). ..... 76

## Introdução

A oncologia continua a ser um campo da medicina com muitas questões por responder e cada vez mais é uma área de grande investimento científico. Muitos sonham tornar o mundo da oncologia num mundo em que as terapêuticas sejam individualizadas e dirigidas a cada tipo de tumor.

O trabalho teve como objetivo principal apresentar o caso de uma mulher adulta com o diagnóstico de cancro da mama, caracterizando a patologia e tentando perceber de que forma os novos métodos de sequenciação de genes nos podem ajudar a caracterizar os tumores e de que maneira poderão influenciar a nossa prática clínica. Sabendo a origem e as alterações genéticas presentes em cada tumor talvez fosse possível direcioná-lo para a terapêutica mais adequada – terapêutica dirigida a cada alteração genética. Assim, estaríamos a fazer uma medicina mais personalizada, em que esta caracterização tumoral a nível genético, forneceria aos médicos informações práticas para apoiar e orientar as decisões de tratamento para cada paciente, com base no perfil genético do seu tumor.

## Epidemiologia da Doença Oncológica

Em 2018 houve cerca de 17 milhões de novos casos de cancro em todo o mundo (1), sendo que cerca de 40% poderiam ser prevenidos reduzindo a exposição aos fatores de risco (2). No mesmo ano, as neoplasias foram responsáveis por cerca de 9,6 milhões de mortes (1).

As causas mais comuns de morte por cancro em todo o mundo são os cancros do pulmão, colorretal, estômago e fígado, sendo estes responsáveis por mais de 40% de todas as mortes por cancro (1).

O cancro mais frequente no mundo é o cancro do pulmão com uma incidência estimada em 2018, de cerca de 2 093 876 casos no mundo, em ambos os sexos e para todas as idades. Em segundo lugar surge o cancro da mama com uma incidência estimada de 2 088 849 casos e em terceiro o cancro da próstata com 1 276 106 (Figura 3) (2).

Quando observamos estas estatísticas para cada um dos sexos, no homem, o cancro mais frequente é o do pulmão, com uma incidência estimada de 1 368 524, em

segundo lugar surge o cancro da próstata com uma incidência de 1 276 106 e em terceiro o cancro colorretal com uma incidência de 1 026 215 (Figura 4). Já no sexo feminino, a neoplasia mais frequente é o cancro da mama, com uma incidência estimada de 2 088 849, em segundo lugar surge o cancro colorretal (com menos de metade da incidência de cancro da mama), tendo uma incidência de 823 303 e apenas em terceiro lugar surge o cancro do pulmão com uma incidência de 725 352 casos em 2018 (Figura 5) (2).

Relativamente à mortalidade, quando analisamos o número estimado de mortes mundiais devidas a cada neoplasia em particular, em ambos os sexos e em todas as idades, o cancro do pulmão surge em primeiro lugar com um número absoluto estimado de 1 761 007 mortes em 2018. Em segundo lugar surge o cancro colorretal com um número absoluto estimado de 880 792 e em terceiro o cancro do estômago que apresenta 782 685 mortes estimadas no mesmo ano (Figura 6).

Quando observamos os mesmos dados relativos a mortalidade, mas apenas no sexo masculino, o cancro responsável por um maior número de mortes é o cancro do pulmão, responsável por um número estimado de 1 184 947 mortes em 2018. De seguida, vem o cancro do fígado com um número absoluto de óbitos de cerca de 548 375 e em terceiro o cancro do estômago com 513 555 (Figura 7).

Ao analisarmos os mesmos dados para o sexo feminino, observamos que a maior mortalidade se deve ao cancro da mama, tendo este sido responsável por cerca de 626 679 mortes em mulheres no ano de 2018. Em segundo lugar nas causas de mortalidade por neoplasias surge o cancro do pulmão com 576 060 e em terceiro o cancro colorretal com uma mortalidade de 396 568 (Figura 8).

Na Figura 9, na Figura 10 e na Figura 11 estão representados os gráficos que relacionam a incidência e a mortalidade estimada em números absolutos, em ambos os sexos, no sexo masculino e no sexo feminino respetivamente (3).

Relativamente a dados Nacionais, em 2010, foram diagnosticados 46 724 novos casos de cancro, sendo que as neoplasias mais frequentes foram os cancros colorretal, da próstata, da mama e do pulmão, que em conjunto representaram 51,2% do total dos casos de doença oncológica em Portugal (4).

Em 2010, em Portugal, no homem, o cancro da próstata foi o cancro mais incidente com 6 080 novos casos diagnosticados, seguido pelo cancro colorretal, com 4 390, pelos

cancros da traqueia, brônquios e pulmão com 2 915 novos casos e pelo estômago com 1 760 (4).

Em Portugal, no sexo feminino, no mesmo ano, o cancro da mama foi o mais diagnosticado com 6 541 novos casos, seguido pelo cancro colorretal com 3 050, o cancro da tireoide com 1 315 e o cancro do estômago com 1 174 (4).

Relativamente a mortalidade, o RORENO, refere que em 2010 as doenças oncológicas foram responsáveis por 24 917 óbitos (14 918 homens e 9 999 mulheres) (4).

Os tumores responsáveis por maior mortalidade no homem foram os da traqueia, brônquios e pulmão com 2 905 óbitos, colorrectal com 2 214 e próstata com 1 783 (4).

Na mulher as neoplasias com maior mortalidade absoluta foram o cancro da mama com 1 695, cólon e reto com 1 517 e estômago com 943 (4).

Atualmente, apesar das melhorias no tratamento, o diagnóstico do cancro em estadio precoce continua a ser o principal fator que influencia a capacidade de cura, sendo que as taxas de sobrevida são cinco a dez vezes maiores em doentes com diagnóstico precoce face àqueles com doença avançada (5).

## Desafios atuais na oncologia

A oncologia tem ainda muitos desafios, nomeadamente no que diz respeito a tumores de origem indeterminada e a neoplasias que têm origem em muitas linhas germinativas.

Outro dos desafios muito presente na prática clínica é o surgimento de recidivas, devido ao aparecimento de mecanismos de resistência que contornam a ação da terapêutica utilizada.

Assim sendo, é cada vez mais importante tentar caracterizar os tumores a nível molecular e genético, para perceber qual o tipo de célula precursora que lhe deu origem e qual o tipo celular responsável pela progressão em cada momento do decurso da doença. Depois de termos uma caracterização do tipo de célula neoplásica e de sabermos de que forma estas alterações contribuem para o mecanismo de perpetuação das células, torna-se

mais simples desenvolver fármacos capazes de neutralizar moléculas ou inativar genes implicados na oncogénese.

A compreensão dos processos moleculares subjacentes às neoplasias tem-se traduzido no desenvolvimento de terapêuticas específicas, que alteram a gestão clínica de alguns cancros. Quando existe um par validado de biomarcador-fármaco, os *outcomes* da terapêutica dirigida a biomarcadores são geralmente positivos, levando, nomeadamente, a uma melhoria da sobrevida (6).

### Importância deste trabalho e impacto

O cancro da mama é um dos cancros mais comuns, sendo a neoplasia mais frequente no sexo feminino, o cancro de maior mortalidade na mulher jovem e a principal causa de morte relacionada com o cancro em mulheres europeias (7). A sua divisão em diferentes subtipos tem, ao longo dos anos, ditado alterações na terapêutica mais adequada de acordo com a expressão e/ou amplificação (caso específico do *human epidermal growth factor receptor 2* (HER-2)) de diferentes recetores.

Atualmente, tentamos caracterizar da melhor forma o subtipo tumoral para ser feita uma terapêutica mais personalizada de acordo com as suas características. Por este motivo, a caracterização genética das células oncológicas poderá permitir-nos estabelecer novas abordagens terapêuticas e eventualmente permitir uma diferente progressão da doença em cada doente.

### Comprehensive Genetic Profiling

O *Comprehensive Genetic Profiling* (CGP) fornece um conhecimento da caracterização genética das neoplasias e identifica frequentemente mutações nas quais podemos potencialmente atuar, detetando vulnerabilidades no tumor que possam ser suscetíveis a novas terapêuticas alvo (6,8).

Apesar de existirem ainda diversos ensaios em curso, a análise do CGP parece revelar mutações com potenciais opções de tratamento na maioria dos pacientes perfilados. No entanto, existem ainda múltiplas barreiras à sua utilização por rotina, e

apenas uma pequena minoria dos pacientes parece beneficiar do conhecimento da caracterização genética da sua neoplasia (6).

Atualmente, o CGP dos tumores pode fornecer informações sobre alterações genéticas clinicamente relevantes, com o objetivo de orientar a tomada de decisões clínicas e aumentar as opções terapêuticas. A acessibilidade desta tecnologia poderia então direcionar-nos para uma medicina de precisão, identificando populações específicas de pacientes com maior probabilidade de obter benefício, de uma terapêutica específica dirigida a um certo alvo (6).

As alterações genéticas detetadas estão frequentemente relacionadas com vias moleculares funcionalmente relevantes, sendo que, as vias mais frequentemente alteradas parecem ser as que possuem mutações, amplificações ou deleções em genes de regulação do ciclo celular (6).

A mutação no gene p53 parece ser a alteração monogénica mais frequentemente identificada, sendo encontrada em cerca de 48% das amostras testadas. As alterações da via da *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K)-AKT e da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) parecem também ser bastante frequentes e identificadas em cerca de 21% e 28% das amostras, respetivamente (6).

Na realidade quando se realiza CGP, verifica-se que, apesar de cerca de 93% dos pacientes terem alterações genéticas possíveis de atuar com uma terapêutica direcionada a essa alteração (sejam estas terapêuticas recomendadas ou *off-label*), apenas uma pequena porção beneficia efetivamente desta medida. A taxa de benefício (definida como doença estável, resposta parcial e/ou resposta completa à terapêutica) do CGP em diversos estudos parece encontrar-se entre 2-8% (6). Sendo que, esta taxa parece ser mais baixa quanto mais elementos forem incluídos no estudo, fazendo-nos pensar que taxas mais baixas coincidem com valores mais próximos dos valores reais (embora se saiba que estes valores variam de acordo com os critérios de elegibilidade dos doentes em cada ensaio).

Verifica-se que há vários motivos para os doentes não receberem terapêutica dirigida à alteração genética detetada com base no resultado do CGP do seu tumor. Isto ocorre devido à existência de:

- Alterações detetadas pelo CGP que já eram conhecidas pelos testes de biomarcadores;

- Pacientes que ainda estão a receber tratamento recomendado, *off-label*, ou que estão em ensaios clínicos não sugeridos pelos resultados do CGP; ou doentes nos quais a abordagem terapêutica ou em ensaios teria ocorrido independentemente da solicitação do CGP;
- Pacientes que deixaram de ser candidatos a terapêutica dirigida devido ao baixo *performance status* ou à deterioração do seu estado geral – doentes em que o GCP é feito muito tarde no decurso do tratamento e deixa de ter utilidade clínica;
- Pacientes nos quais a realização do CGP é efetuada no início do curso do tratamento da doença, obtendo-se resultados que já não são aplicáveis em fases mais tardias da progressão da doença (sendo que as alterações genéticas e moleculares ao longo da progressão podem evoluir);
- Pacientes com doença em remissão sem indicação para terapêutica, em que o GCP é feito em estadios precoces da doença já tendo existido terapêutica curativa;
- Ausência de mutação sob a qual seja possível atuar;
- Pacientes que já tenham falecido por doença rapidamente progressiva antes da possibilidade de acesso aos resultados do CGP (6).

É ainda importante referir que existe complexidade biológica tumoral inerente, heterogeneidade intratumoral e uma grande variedade de alterações genéticas que provocam algum viés na seleção das terapêuticas. Muitos cancros não têm uma mutação que seja claramente a mais importante para a sobrevivência e proliferação das células neoplásicas. Assim sendo, uma terapêutica alvo contra uma qualquer alteração genética detetada, poderá não ter efeito na história natural da doença e estes doentes não vão beneficiar de uma abordagem direcionada (6).

Também a atividade de uma terapêutica alvo direcionada a uma mutação particular, pode ser diferente entre diferentes tipos de tumores com a mesma mutação (6).

Assim, a evidência que existe acerca da utilização do CGP como rotina na prática clínica, parece refletir pouco benefício relativamente ao controlo da doença. Por este motivo, o CGP deve ser feito apenas em doentes selecionados e devem ser evitados doentes que não beneficiarão desta análise (nomeadamente doentes com doença



rapidamente progressiva ou com baixo *performance status*) pois testar estes pacientes parece não alterar os *outcomes* (6).

### Sequenciação genética de nova geração

A carcinogênese é um processo que se desenvolve em várias etapas, impulsionado por alterações genéticas que levam à desregulação das vias de sinalização, que consequentemente permitem a proliferação e a disseminação tumoral (6). Assim sendo, a compreensão das alterações genéticas do tumor pode ter um papel importante na abordagem clínica.

A sequenciação genética de nova geração é um método que permite a sequenciação simultânea de milhões de fragmentos de DNA (ou DNA complementar), permitindo a análise de vários genes ou regiões de genes. Tem atualmente diversas utilidades a nível médico, nomeadamente na análise de células da linha germinativa e células somáticas (9).

Na área da oncologia existem *targeted panels* que podem ser mais alargados ou mais restritos para um subtipo tumoral particular. Os genes que constituem estes painéis podem ser sequenciados completamente ou apenas parcialmente. Na prática clínica, não é comum utilizar-se a sequenciação de todo o genoma ou de todos os exões, o mais comum é serem pesquisados genes que se sabe terem um papel importante na carcinogênese de cada subtipo tumoral (9).

Há estudos que mostram que a maioria dos pacientes com doença avançada, após a sequenciação de nova geração, tem opções adicionais de tratamento com base nos seus perfis genéticos e que vários pacientes com doença refratária, sem terapêutica *standard* disponível, apresentam excelentes respostas após o tratamento com agentes moleculares específicos (8).

Assim sendo, a sequenciação de nova geração pode ser importante por diversas razões.

Em primeiro lugar, podem ser identificadas novas terapêuticas potencialmente ativas, permitindo a integração de doentes elegíveis em ensaios clínicos. Por outro lado, mesmo quando a sequenciação não nos dá informação genética relevante, esta pode ser

cl clinicamente útil, pois permite direcionar os pacientes para testes clínicos não orientados pela genotipagem (por exemplo ensaios de imunoterapia ou quimioterapia) (8).

Em segundo lugar, podem ser encontradas novas alterações genéticas, levando a estudos pré-clínicos e novos ensaios clínicos (8).

Em terceiro lugar, pode ajudar a definir o prognóstico e as características moleculares patológicas dos tumores, facilitando o desenvolvimento de ensaios que se baseiem em mutações específicas, independentemente da histologia do tumor (8).

Por último, pode ainda ser usada como uma estratégia de sequenciação inicial para investigar respostas inesperadas em ensaios clínicos, de modo a ser possível efetuar comparação com ensaios clínicos análogos com abordagens previamente publicadas (8).

### Limitações da sequenciação de nova geração

Apesar da sequenciação de nova geração poder ter um papel importante na abordagem de alguns doentes, esta técnica possui ainda algumas limitações, de entre as quais se destacam as relacionadas com:

- Sensibilidade analítica na deteção de uma mutação: existe alguma dificuldade em detetar doença residual mínima e algumas mutações presentes em pequenas quantidades devido a heterogeneidade tumoral;
- Áreas do genoma difíceis de sequenciar ou analisar: algumas áreas do genoma, como regiões homólogas, regiões com várias repetições de bases e regiões ricas em ligações C-G, não são corretamente interpretadas pelos métodos de sequenciação;
- Interpretação de mutações novas ou raras: apesar de ser possível analisar e sequenciar todo o genoma, ainda não existe conhecimento suficiente de como interpretar toda esta informação;
- Pouca sensibilidade em detetar alterações genéticas estruturais e alterações no número de cópias: a sequenciação de nova geração deteta razoavelmente bem pequenas inserções, deleções e mutações isoladas de um único nucleótido, mas tem mais dificuldade em detetar alterações genéticas estruturais ou variações no número de cópias;

- Integração da informação genética na prática clínica: é necessário tempo, recursos materiais (por exemplo novas tecnologias) e pessoais (médicos, bioquímicos, patologistas e outros profissionais), para integrar este conhecimento na prática clínica (9).

### Utilização do DNA livre

Atualmente verifica-se que, em até 30% dos casos as amostras tumorais obtidas por biópsias invasivas ou procedimentos cirúrgicos, são insuficientes para a realização dos testes necessários e, por este motivo, as biópsias líquidas e os ensaios do perfil genético do DNA circulante são cada vez mais usados, especialmente quando existe pouca quantidade de tecido tumoral e/ou quando este é insuficiente para a realização de testes moleculares (10).

A sequenciação do DNA livre que se encontra fora das células tem essencialmente duas aplicações clínicas: testes pré-natais e biópsias líquidas (9,11).

Nas biópsias líquidas é analisado o DNA tumoral circulante (ctDNA), que é um fragmento de DNA derivado do tumor, que se encontra no sangue e que não está associado a células (5,10,12). Este faz parte do DNA livre de células (cfDNA) que é o DNA que circula livremente na corrente sanguínea e que inclui adicionalmente o DNA com origem em células não tumorais (10,11).

As alterações somáticas derivadas do tumor podem ser detetadas no plasma de doentes oncológicos quando analisamos o cfDNA, sendo que estas alterações genéticas somáticas estão presentes no ctDNA mas não estão no DNA de células normais (5,11). Na maioria dos doentes com doença metastática encontram-se concentrações relativamente altas de fragmentos de DNA com mutações, e em grande parte dos doentes com doença localizada, estes existem em concentrações baixas mas detetáveis (12). Em tumores em estadio avançado, há uma alta sensibilidade, sendo que a mutação encontrada no tecido tumoral corresponde à mutação da porção de ctDNA em virtualmente todos os casos (11).

As alterações genéticas possíveis de avaliar num fragmento de ctDNA são mutações pontuais, rearranjos, amplificações e aneuploidias, sendo que virtualmente todos os cancros têm alterações genéticas somáticas e que as mais frequentes são as

substituições e os rearranjos. Outra particularidade a salientar é que o tipo mutação não fornece muita informação sobre o tipo tumoral (11,12).

Atualmente, ainda não se sabe muito sobre a variabilidade fisiológica (variação diurna) e cinética de *clearance* do cfDNA e do ctDNA. A relação quantitativa entre o nível relativo e absoluto de ctDNA no sangue e as características biológicas do tumor (genótipo, tamanho e vascularização) também ainda não são conhecidas (5).

O ctDNA é uma medição direta do tumor e tem o potencial de ser mais específico do que as medições de outros marcadores (como proteínas e metabolitos) na detecção de neoplasias (5,11,12). Mais de 80% dos pacientes com doença metastática têm níveis detetáveis de ctDNA, níveis estes que são superiores aos reportados para os biomarcadores convencionais. Adicionalmente, enquanto as alterações genéticas detetadas pelo ctDNA apenas estão presentes nas células neoplásicas, os biomarcadores convencionais estão presentes em células neoplásicas e em células normais (mas em maiores quantidades nas células neoplásicas) (12).

Os tumores benignos e as condições não neoplásicas não libertam ctDNA e, por este motivo, não parece existir sobrediagnóstico na presença de uma destas condições (12).

Em geral, os pacientes com neoplasias têm também níveis mais elevados de cfDNA normal do que indivíduos saudáveis (11).

À medida que o tumor aumenta de volume, aumenta também o *turnover* celular e o número de células necróticas e apoptóticas. Em situações normais, as células necrosadas e apoptóticas são fagocitadas pelos macrófagos (5,11). No entanto, em situações tumorais, por ineficiência deste processo, há acumulação de detritos celulares que de seguida entram em circulação (11). Na Figura 12 podemos observar esquematicamente como ocorre este processo. A passagem do cfDNA para a corrente sanguínea depende de fatores como a localização, o tamanho e a vascularização do tumor, sendo que a fração de DNA circulante de origem tumoral varia entre 0,01% e mais de 90% (11). Também alguns obstáculos físicos como a barreira hemato-encefálica e a mucina podem dificultar a passagem de ctDNA para a corrente sanguínea (12).

O conjunto único de alterações somáticas cria uma assinatura biológica, que é altamente específica de cada tumor e parece ser específica do cancro em geral quando

comparado com os tecidos normais. Os tumores sólidos são biologicamente diferentes e têm uma grande variação entre DNA, RNA e epigenética. Esta diferença não ocorre apenas entre tecidos diferentes, mas também entre diferentes tipos tumorais do mesmo tipo de tecido (5).

A detecção do ctDNA e do cfDNA em pacientes com cancro tem sido correlacionada com: a carga tumoral, o estadio tumoral avançado, a presença de metástases, a resposta ou resistência à terapêutica, a recidiva e o mau prognóstico. Há ainda uma grande correlação entre a concentração de ctDNA e a sobrevida (5,10–13).

As alterações na quantidade de ctDNA podem refletir as alterações dinâmicas da carga metabólica do tumor durante a progressão da doença, sendo que pacientes com tumores metabolicamente muito ativos produzem maiores quantidades de ctDNA (10,12).

A monitorização através da sequenciação de uma mutação já conhecida presente no tumor, correlaciona-se com a progressão e o reaparecimento da doença (9). Adicionalmente, as alterações no ctDNA podem ainda identificar mutações que surjam durante o tratamento (12).

Sendo assim, na prática clínica a sequenciação deste DNA circulante pode ter diversas aplicações futuras, nomeadamente o rastreio ou o diagnóstico de cancro, a monitorização da progressão e recorrência da doença e pode adicionalmente ser utilizado como meio de dirigir a terapêutica em doentes com diagnóstico conhecido (9), sendo que este método não faz ainda parte das recomendações nacionais ou internacionais.

Apesar do ctDNA poder ter menos sensibilidade para detetar mutações do que se for utilizado tecido tumoral, este é frequentemente utilizado nos pacientes com doença metastática, particularmente quando não há tecido tumoral suficiente para testar e quando existe necessidade de realizar biópsias repetidas (visto que estão associadas a aumento da morbilidade e mortalidade) (9,12). Adicionalmente, as biópsias em tecido tumoral têm as desvantagens de analisarem uma amostra única instantânea no tempo, apenas refletirem as alterações do tumor daquela porção (não refletindo a heterogeneidade tumoral), poderem ser difíceis de obter, serem procedimentos invasivos, terem mais complicações clínicas e aumentarem os custos dos cuidados do paciente. Para além destes fatores, a

aquisição e a preservação das amostras são também mais difíceis face às biópsias líquidas (11).

Por outro lado, as biópsias líquidas têm algumas vantagens face às biópsias que têm por base uma amostra tumoral sólida, nomeadamente o facto de serem menos invasivas, demorarem menos tempo a dar um resultado e terem menos custos. Para além disto, fornecem uma medida temporal da carga tumoral e dão-nos uma visão da heterogeneidade tumoral (10). Quando temos uma amostra sólida apenas conseguimos caracterizar as alterações naquela amostra. No entanto, se realizarmos uma biópsia líquida, avaliaremos a quantidade de ctDNA na corrente sanguínea, que reflete o ctDNA libertado pelas células tumorais. Como o ctDNA é libertado pelas diferentes células que constituem a população tumoral (incluindo as células metastáticas e as células que poderiam estar em porções não biopsadas) conseguimos ter uma ideia de muito mais alterações do que as presentes apenas num local biopsado (11).

A maior limitação das biópsias de tecido neoplásico parece ser mesmo esta, visto que os tumores são heterogéneos e diferentes áreas do mesmo tumor podem apresentar diferentes perfis genéticos (conceito de heterogeneidade intratumoral). Assim, quando a amostra é uma porção tumoral, não vai conseguir caracterizar a heterogeneidade intratumoral e intermetastática (11).

As biópsias líquidas têm ainda a vantagem de ser uma fonte de DNA fresco que não necessita da adição de conservantes. O sangue pode ser retirado em qualquer altura durante o curso da doença e da terapêutica, permitindo uma monitorização dinâmica das alterações moleculares em vez de se basear numa avaliação momentânea (como nas biópsias de tecido tumoral) (11). Adicionalmente, o ctDNA tem uma semi-vida inferior a uma hora e meia caracterizando muito bem as alterações genéticas presentes no instante da colheita (12).

Relativamente aos exames radiológicos, estes expõem o doente a radiação sucessiva e são frequentemente pouco informativos para doença abaixo do limiar de resolução da técnica, ou só refletem a progressão da doença mais tardiamente, enquanto as biópsias líquidas têm a vantagem de conseguir, de forma pouco invasiva, monitorizar e detetar a progressão da doença (12).

Apesar das suas vantagens, a sensibilidade para detetar alterações genéticas nas amostras de plasma, parece ser afetada por diversos fatores, destacando-se o nível de ctDNA plasmático libertado pelas células tumorais para o sangue, o seu metabolismo no plasma e a sua percentagem em relação à quantidade total de cfDNA (10).

Ainda pouco se sabe acerca da relação quantitativa entre o nível relativo e absoluto do ctDNA no sangue e as características biológicas do tumor, e também ainda não está muito claro o impacto da carga metabólica do tumor na deteção correta das alterações genéticas quando se utiliza sequenciação de nova geração em amostras de plasma de doentes com cancro (5,10).

A fração de tumores que liberta níveis detetáveis de ctDNA por tipo tumoral e estadio ainda não está bem estudada (5). Estudos mostram que o ctDNA é detetável em mais de 75% dos pacientes com cancro do pâncreas, ovário, colorrectal, bexiga, gástrico, esofágico, mama, melanoma, hepatocelular, cabeça e pescoço em estadios avançados. No entanto, apenas é detetado em menos de 50% dos tumores localizados de cancro do cérebro, dos rins, da próstata e da tiroide (12).

Assim sendo, à luz dos conhecimentos atuais, as biópsias líquidas parecem poder ser aplicadas clinicamente na gestão do doente e o ctDNA poderá futuramente ser usado como um biomarcador em diferentes tumores sólidos e em diferentes indicações clínicas (12).

### *Foundation Medicine®*

A *Foundation Medicine®* é uma empresa que se dedica ao estudo da informação molecular e que tem como objetivo auxiliar a decisão clínica através da compreensão do perfil genético tumoral (14). Esta empresa tem 3 tipos de serviços:

- *FoundationOne® CDx* – utiliza biópsias do tecido tumoral e é direcionado a tumores sólidos (14);
- *FoundationOne® Liquid* - analisa o ctDNA e consiste na realização de biópsias líquidas para caracterização de tumores sólidos (14);
- *FoundationOne® Heme* – direcionado a neoplasias hematológicas e sarcomas (14).

A *Foundation Medicine*<sup>®</sup> dispõe de testes validados para avaliar o *Comprehensive genetic profiling* de diferentes tipos de cancro.

As alterações detetadas podem ser somáticas (não herdadas) ou germinativas (herdadas). No entanto, este teste não distingue entre estes dois tipos.

Os resultados obtidos fornecem diferentes tipos de informações tais como: alterações clinicamente significativas, possíveis terapêuticas-alvo específicas, estudos clínicos disponíveis e marcadores quantitativos de resposta à imunoterapia (14).

De seguida, descrevo a técnica utilizada no caso específico da doente considerada neste trabalho e ainda a técnica *FoundationOne*<sup>®</sup> *Liquid* que embora não tenha sido utilizada nesta doente, também se destina à avaliação de tumores sólidos.

#### *FoundationOne*<sup>®</sup> *CDx*

Este teste é indicado para pacientes que tenham diagnóstico de qualquer tipo de tumor sólido. É um dispositivo de diagnóstico in vitro que utiliza sequenciação de nova geração e deteta substituições, inserções, deleções e alterações no número de cópias em 324 genes. Adicionalmente deteta ainda rearranjos genéticos e assinaturas genéticas (como instabilidades de microssatélites e carga mutacional do tumor).

Este teste tem como objetivo ser um teste complementar para identificar os pacientes que podem beneficiar de tratamentos com algumas das terapêuticas alvo. Na Figura 13 podemos observar as indicações terapêuticas segundo o biomarcador detetado.

Pacientes com amplificação do gene HER-2 devem fazer outro teste de diagnóstico alternativo de confirmação que esteja aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), quando o número de cópias é igual a 4. Enquanto este resultado é considerado negativo pela *FoundationOne*<sup>®</sup> *CDx*, num estudo clínico aprovado pela FDA o teste *fluorescence in situ hybridization* (FISH) foi positivo em 70% dos casos e em apenas 30% o resultado foi considerado negativo. Estima-se que exista uma frequência de 2% de casos de 4 cópias do gene HER-2 (14).

Este teste é realizado exclusivamente num laboratório e utiliza DNA de amostras tumorais. O ensaio emprega um único método de extração de DNA, a partir de biópsias



embebidas em parafina fixadas em formol ou amostras após ressecção cirúrgica. Neste processo, cerca de 50-1000 ng de amostra são submetidos a sequenciação de todo o genoma e captura por hibridização (de todos os exões de 309 genes cancerígenos, uma região promotora, uma região não codificante e 34 regiões intraiônicas selecionadas de 34 genes que têm frequentemente rearranjos - 21 dos quais incluem os exões codificantes) (14).

Após o processamento de dados são detetadas alterações genéticas incluindo substituições de bases, inserções, deleções, alterações no número de cópias (amplificações e deleções de genes homozigóticos) e rearranjos. São ainda reportados dados relacionados com a instabilidade de microssatélites e a carga mutacional do tumor (14).

Este teste tem algumas limitações: apenas pode ser utilizado *in vitro*, as alterações genéticas diferentes das presentes na Figura 13 não são preditivas ou conclusivas para o uso de nenhum fármaco específico, um resultado negativo não impede que exista uma mutação presente abaixo dos limites de detecção da técnica e as amostras com menos de 25% de amostra tumoral podem ter baixa sensibilidade para a detecção de alterações do número de cópias, entre outras (14).

Os resultados deste teste incluem:

- *Companion Diagnostic (CDx) Claims;*
- Mutações cancerígenas com evidência de significado clínico;
- Mutações cancerígenas com potencial significado clínico.

Sendo que as alterações genéticas com potencial significado ou com evidência de significado clínico, não são preditivas ou conclusivas para o uso de nenhum fármaco em específico (14).

Este teste tem uma sensibilidade para substituição de bases >99%, para inserções e deleções >97%, para rearranjos >97% e para alterações de números de cópias >95% (14).

Dados atuais mostram que o *FoundationOne® CDx* identifica alterações genéticas clinicamente relevantes em cerca de 90% dos pacientes selecionados (14).

Na Figura 14 e na Figura 15 apresentam-se as tabelas com os genes incluídos neste teste.

### *FoundationOne® Liquid*

Este teste é uma biópsia líquida e consiste na análise do ctDNA, identificando instabilidade de microssatélite e alterações genéticas relevantes. Para algumas das alterações detetadas aconselha ainda uma terapêutica alvo específica, imunoterapia ou ensaios clínicos em curso (14).

Tal como referido anteriormente, este exame analisa amostras de sangue de pacientes com tumores sólidos (incluindo cancro da mama). De seguida utiliza técnicas de sequenciação de nova geração e algoritmos computacionais para detetar cinco tipos de alterações genéticas (substituições, inserções, deleções, alterações no número de cópias e rearranjos) e instabilidade de microssatélites, avaliando alterações genéticas clinicamente relevantes em 70 genes frequentemente alterados (14).

Na Figura 16, na Figura 17 e na Figura 18 apresentam-se as tabelas com os genes incluídos neste teste.

## **Cancro da mama**

Tal como já referido, o cancro da mama é um dos cancros mais comuns, sendo a neoplasia mais frequente no sexo feminino, o cancro de maior mortalidade na mulher jovem e a principal causa de morte relacionada com o cancro em mulheres europeias. A nível global é responsável por mais de 500 000 mortes anuais no mundo (7,15,16).

Em 2010, o registo nacional RORENO reportou uma incidência global em Portugal de 6 680 novos casos (67 no homem e 6 541 na mulher). Relativamente à mortalidade, o cancro da mama foi responsável por um total de 1 678 mortes (19 no homem e 1 659 na mulher) (4).

Segundo o relatório de 2017 da Direção-Geral da Saúde (DGS), a mortalidade por cancro da mama está a aumentar todos os anos, tendo tido um pico de 1 752 em 2012. Em 2013 houve um pequeno decréscimo para 1 640 mortes, e desde essa altura tem

continuado a existir um aumento progressivo, tendo sido responsável por um número absoluto de óbitos de 1 683 no ano de 2015 (último ano com registo neste relatório) (17).

Parece existir uma assimetria regional a nível da mortalidade, com uma maior taxa de mortalidade standardizada no Alentejo, na ilha da Madeira e em Lisboa e Vale do Tejo (quando comparados com as zonas Norte, Centro, Algarve e ilha dos Açores) (17).

Os fatores de risco mais importantes para cancro da mama incluem: predisposição genética, exposição a estrogénios (endógenos ou exógenos), radiação ionizante, baixa paridade, história de hiperplasia atípica, obesidade, consumo de álcool e alimentação à base de uma dieta ocidental (7).

Parece existir ainda um gradiente de idade muito marcado, com cerca de 25% dos cancros da mama a ocorrerem antes dos 50 anos e menos de 5% antes dos 35 anos. Relativamente à incidência, esta parece aumentar com o aumento da idade e também com o aumento do número de rastreios realizados numa população (7).

Apesar da mortalidade do cancro da mama ter diminuído nas últimas décadas graças à melhor compreensão dos fatores de risco, das estratégias preventivas e da melhoria da abordagem terapêutica, prevê-se que no futuro a mortalidade continue a diminuir ainda mais (15). A sobrevida do cancro da mama aos dez anos é superior a 70% na maioria das regiões europeias, havendo 89% de sobrevida na doença local e 62% na regional. O risco anual de recorrência é máximo no segundo ano após o diagnóstico, mas permanece em cerca de 2% aos 5 anos e 5% aos 20 anos (7).

O diagnóstico de cancro da mama, baseia-se na avaliação clínica em combinação com testes de imagem e é confirmado por biópsia (esta é necessária para garantir o diagnóstico de doença invasiva e avaliar os biomarcadores) (7).

Diferentes tipos de cancro da mama podem ter origem em diferentes tipos de células mamárias. Nos cancros da mama benignos, as células neoplásicas crescem mas não se disseminam, pois são cancros não invasivos sendo que a membrana basal não apresenta disrupção, enquanto nos cancros da mama malignos, as células neoplásicas podem invadir os tecidos adjacentes e metastizar através dos vasos linfáticos e/ou vasos sanguíneos (15).

Os cânceros da mama podem ser esporádicos ou familiares. A maioria são esporádicos sendo que os familiares são apenas responsáveis por 5-10% dos casos e resultam de mutações (sendo as mais frequentes nos genes supressores de tumores BRCA1 e BRCA2) (15).

Os fatores de prognóstico mais importantes no cancro de mama são:

- expressão de Recetores de Estrogénio (RE);
- expressão de Recetores de Progesterona (RP);
- sobreexpressão de HER-2;
- expressão de marcadores de proliferação;
- número de gânglios regionais envolvidos;
- histologia do tumor;
- tamanho;
- grau;
- presença de invasão vascular peri-tumoral (7).

### Subtipos moleculares

No cancro da mama existem diferentes subtipos com características moleculares, história natural da doença, tratamento e prognóstico distintos. A baixo referem-se algumas das principais características para cada subtipo tumoral, descrevendo os subtipos com impacto na prática clínica segundo a *European Society for Medical Oncology* (ESMO) (7).

Subtipo luminal A – este subtipo tem origem nas células luminais internas dos ductos, tem RE e RP positivos, HER-2 negativo e Ki67 baixo (7,15).

Este é o subtipo mais comum, com uma frequência de 50-70%. É o subtipo com melhor prognóstico e a opção de tratamento mais eficaz para estes pacientes é a hormonoterapia. A alta expressão de RE é geralmente associada a menor benefício absoluto da quimioterapia convencional, sendo esta apenas utilizada em casos de alto risco (7,15).

Subtipo luminal B – tal como o subtipo anterior, tem origem nas células luminais internas dos ductos. Ocorre em 20% dos casos e tem pior prognóstico (15).

Estes tumores têm RE positivos e subdividem-se em dois subtipos: Luminal B HER-2 negativo (com RP baixo, HER-2 negativo e Ki67 elevado) e Luminal B HER-2 positivo (com HER-2 positivo e quaisquer RP e Ki67). Relativamente à terapêutica, ambos beneficiam de quimioterapia e hormonoterapia, sendo que o subtipo Luminal B HER-2 positivo beneficia adicionalmente de terapêutica com Trastuzumab (7,15).

Subtipo HER-2 – neste subtipo os RE e RP são negativos, mas o HER-2 é positivo (7,15). A sobreexpressão ou amplificação de HER-2 parece estar presente em aproximadamente 15-30% dos cânceros da mama e tem um mau prognóstico (15,18,19). Geralmente ocorre por amplificação e origina hiperproliferação celular (15,20).

Este subtipo beneficia de terapêutica com quimioterapia e terapêutica alvo anti-HER-2 (7). As opções terapêuticas atuais para estes pacientes incluem anticorpos monoclonais (Trastuzumab e Pertuzumab), inibidores de tirosina-cinase (Lapatinib e Neratinib) e uma associação de um anticorpo monoclonal com um citotóxico (Trastuzumab-DM1). Estes fármacos são muitas vezes associados a quimioterapia (15,19). Antes de existirem estas terapêuticas dirigidas, os tumores com recetor HER-2 positivo tinham as piores taxas de sobrevida global e sobrevida livre de doença, comparando com os outros subtipos tumorais (incluindo o triplo negativo) (16,19).

Subtipo triplo negativo – Tem origem nas células externas dos ductos (células basais) e, tal como o nome indica, RE, RP e HER-2 negativos. São os tumores mais agressivos e heterogêneos, sendo responsáveis por 10-30% dos casos. A terapêutica adequada continua a ser a quimioterapia, devido à falta de recetores positivos neste subtipo tumoral (7,15).

Na Tabela 1 temos um quadro resumo dos recetores expressos em cada um destes subtipos.

*Tabela 1 – Tabela adaptada de “ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up” (7) com representação dos subtipos intrínsecos do cancro de mama.*

		RE	RP	HER-2	Ki67
Luminal A		positivo	elevado	negativo	baixo
Luminal B	HER-2 negativo	positivo	baixo	negativo	elevado
	HER-2 positivo	positivo	qualquer	positivo	qualquer
Sobreexpressão de HER-2		negativo	negativo	positivo	
Triplo Negativo		negativo	negativo	negativo	

## Terapêuticas

A escolha da estratégia terapêutica no cancro da mama deve basear-se na carga tumoral e na localização do tumor (tamanho e localização do tumor primário, número de lesões e extensão do envolvimento dos gânglios linfáticos), na sua biologia (incluindo biomarcadores e expressão genética), bem como na idade e estado geral de saúde do doente (7,15).

Assim, existem várias opções terapêuticas:

Terapêuticas locais – incluem opções para o tratamento da mama e da área regional, nomeadamente dos gânglios linfáticos. Inclui a cirurgia e a radioterapia.

- **Cirurgia:** Inclui a tumorectomia (remoção do tumor) e a mastectomia (remoção de uma ou ambas as mamas) (15). Atualmente, na Europa Ocidental, 60-80% dos cancros da mama recém-diagnosticados são passíveis de cirurgia conservadora da mama. No entanto, nalguns pacientes, a mastectomia ainda é realizada devido essencialmente ao tamanho do tumor em relação ao tamanho da mama, à multicentricidade do tumor, à incapacidade de atingir margens cirúrgicas negativas após múltiplas ressecções, à presença de radiação prévia sobre a parede torácica ou mama, à existência de outras contraindicações para radioterapia ou devido à preferência do paciente (7).
- **Radioterapia (RT):** consiste em aplicar ondas de alta energia para eliminar as células cancerígenas. Pode ser aplicada externamente, usando radiação fora do corpo, ou internamente (braquiterapia), em que o material

radioativo é colocado dentro do corpo perto do tumor. A radioterapia pode ser usada para reduzir o risco de recorrência do cancro da mama e para melhorar as taxas de sobrevida em diferentes estadios tumorais (15). A RT sobre toda a mama está recomendada em todos os doentes após cirurgia conservadora da mama e após mastectomia apenas em doentes selecionados. Pode ainda estar indicada na presença de gânglios axilares positivos, após mastectomia e como opção após terapêutica sistémica caso o tumor se mantenha irressecável (7).

Terapêuticas sistémicas – incluem o uso de fármacos que vão atuar em células cancerígenas em todo o corpo (15). Estas terapêuticas estão recomendadas na maioria das pacientes que apresentam doença metastática e doença não-metastática irressecável. Podem também ser utilizadas de forma adjuvante em casos selecionados (7). Podem ter administração *per os* ou intravenosa e incluem a quimioterapia, a hormonoterapia e a terapêutica alvo.

- Quimioterapia (QT): apesar de poder destruir eficazmente as células cancerígenas, tem também efeitos adversos indesejáveis sobre as células normais. Os fármacos de quimioterapia mais usados no cancro da mama são: Carboplatina, a Cisplatina e o 5-fluorouracilo. A combinação de vários fármacos pode originar uma resposta mais favorável, sendo que a adição de Taxanos melhora a eficácia da quimioterapia mas à custa de um aumento da toxicidade não-cardíaca (7,15). No cancro da mama, pode ser utilizada tanto de forma adjuvante como neoadjuvante. A QT está recomendada na grande maioria dos cancros de mama triplo-negativos, com sobreexpressão de HER-2 e em tumores luminais HER-2 negativos de alto risco. O seu benefício máximo é mais pronunciado em tumores RE negativos (7).
- Hormonoterapia (HT): O cancro da mama foi uma das primeiras neoplasias em que a hormonoterapia foi utilizada com bons resultados (20). Muitos dos cancros da mama são hormonodependentes e através de recetores as hormonas ligam-se às células, promovendo o seu crescimento e a sua proliferação. A hormonoterapia consiste em bloquear os recetores hormonais e/ou diminuir os níveis destas hormonas em circulação (15,20). O fármaco desta categoria mais frequentemente

utilizado é o Tamoxifeno (bloqueador do recetor hormonal dos estrogénios). Existem ainda outros fármacos que inibem a aromatase e por isso diminuem os níveis de estrogénios em circulação, como o Anastrozole, o Exemestano e o Letrozole (15,20). Para além da sua eficácia, os fármacos da hormonoterapia são menos tóxicos que a quimioterapia tradicional (15). Este tipo de terapêutica está recomendado em todos os subtipos luminais (7).

- Terapêutica alvo: consiste na utilização de anticorpos monoclonais ou pequenas moléculas inibidoras, que têm a capacidade de bloquear fatores que estão envolvidos em processos como o crescimento celular, a proliferação, a reparação e a metastização. Ao contrário da quimioterapia e da radioterapia, a terapêutica alvo afeta preferencialmente as células cancerígenas (15). Para que a terapêutica alvo seja eficaz é necessário que exista a identificação de pelo menos um alvo expresso em cada tipo particular de tumor (15). No cancro da mama a descoberta da sobreexpressão de HER-2 levou ao desenvolvimento de múltiplos fármacos que têm este recetor como alvo, nomeadamente o Trastuzumab (20). Este tipo de terapêutica é muitas vezes utilizado em combinação com a quimioterapia. Na Figura 19 está representada uma linha do tempo, que mostra as opções terapêuticas de terapêutica alvo aprovadas pela FDA, para o tratamento do cancro da mama HER-2 positivo.

Na Figura 20 e na Figura 21, estão representados: um algoritmo onde consta a abordagem à terapêutica do cancro da mama em estadio inicial e outro que indica a terapêutica (neo)adjuvante sistémica mais adequada a cada subtipo tumoral, respetivamente.

### Generalidades sobre o HER-2

O HER-2 é um membro da família dos recetores do fator de crescimento epidérmico, que adicionalmente inclui: HER-1, HER-3 e HER-4. Estas tirosina-cinases desempenham um papel importante no crescimento celular e estão frequentemente ativas em diversos tipos de cancro, incluindo o da mama (16,18).



Num estado normal, o HER-2 é expresso em pequenas quantidades na superfície das células epiteliais e é necessário para o desenvolvimento normal de muitos tecidos. No entanto, nas células neoplásicas, a sobreexpressão de HER-2 e a sua ativação vão desencadear múltiplas vias envolvidas na proliferação celular, transcrição, motilidade e inibição da apoptose das células cancerígenas, proporcionando o crescimento tumoral (16,18).

O HER-2 forma homo ou heterodímeros com outros recetores da família HER, e esta dimerização origina a auto e/ou transfosforilação de resíduos de tirosina no domínio intracelular citoplasmático de cada um dos recetores. Após a dimerização há ativação das proteínas e das vias Ras/Raf/MAPK, PI3K/AKT e *Phosphoinositide phospholipase C $\gamma$*  (PLC $\gamma$ )/ *Protein kinase C* (PKC). Adicionalmente, a dimerização de HER-2 promove a mudança de localização e a rápida degradação da proteína p27 (que na sua função normal inibe o ciclo celular), levando à progressão do ciclo celular (18).

#### Mecanismos de resistência aos bloqueadores do domínio extracelular do HER-2

Apesar da descoberta dos anti-HER-2 ter mudado muito o prognóstico dos doentes com cancro da mama com sobreexpressão deste recetor, existem muitas mulheres que desenvolvem doença metastática, apesar de terem sido tratadas com terapêutica anti-HER-2 no início da doença (16).

Embora geralmente exista uma resposta clínica significativa aos fármacos anti-HER-2, cerca de 40-60% dos pacientes com cancro da mama metastático HER-2 positivo não respondem ao tratamento, refletindo a existência de mecanismos de resistência intrínsecos ou adquiridos (19).

Os mecanismos de resistência aos fármacos que bloqueiam o domínio extracelular do recetor HER-2 (nomeadamente o Trastuzumab) podem ser subdivididos em 3 grupos, segundo o seu mecanismo de ação (18):

- Por *steric effects*;
- Por sobreexpressão de outros recetores tirosina-cinase;
- Por alterações intracelulares na sinalização a jusante do HER-2.

### *Steric effects*

Neste grupo de alterações, a resistência aos fármacos pode ser obtida por ausência ou alteração do domínio extracelular do HER-2 e/ou por expressão aumentada de mucina-4.

- Ausência/alteração do domínio extracelular do HER-2 (HER-2 com ação canónica)

Uma das formas de resistência aos fármacos que interagem com os domínios extracelulares do HER-2, é a presença de uma alteração que elimine o domínio extracelular por clivagem proteolítica, não permitindo a sua ligação aos fármacos. Este processo origina uma isoforma truncada com o nome de p95HER2 que fica constitutivamente ativa. Assim sendo, esta proteína tem atividade cinase mas não possui o domínio extracelular e o local de ligação ao Trastuzumab, permitindo a sinalização da via apesar da presença do fármaco. Esta isoforma promove a ativação permanente da sinalização oncogénica e faz um *bypass* aos efeitos do Trastuzumab (16,18,19).

Há estudos que demonstraram que pacientes com cancro da mama metastático com sobreexpressão de p95HER2 têm taxas de resposta consideravelmente menores ao Trastuzumab, em comparação com pacientes que expressam HER-2 com a estrutura e o tamanho normais (16).

- Expressão aumentada de mucina-4

Outro mecanismo que pode contribuir para a alteração do local de ligação do HER-2 ao Trastuzumab é a expressão aumentada de mucina-4 (CA 125). Embora ainda não se saiba de que maneira confere resistência ao Trastuzumab, a sua expressão foi correlacionada com mau prognóstico em diversos tipos de carcinoma (nomeadamente da mama) (18).

### *Sobreexpressão de outros recetores tirosina-cinase*

A sobreexpressão de outros recetores tirosina-cinase, que amplifiquem vias de sinalização comuns à ativação do recetor HER-2, também pode constituir um mecanismo de resistência. Dentro dos recetores que podem ter este efeito, destacam-se o HER-3, o recetor do fator de crescimento semelhante à insulina, o recetor de tirosina-cinase *Tyrosine-protein kinase MET* (c-MET) e o recetor da eritropoetina.

- Sobreexpressão de HER-3

Como estes fármacos não previnem a dimerização do HER-3, a sobreexpressão deste recetor pode colmatar a inibição da sinalização pelo HER-2 mediada pelos fármacos anti-HER-2. A co-expressão de HER-3 e HER-2 e a dimerização de HER-2-HER-3, resultam num aumento da fosforilação do HER-3, o que aumenta subsequentemente o recrutamento da PI3K e a ativação da via a jusante (18).

- Sobreexpressão do recetor do fator de crescimento semelhante à insulina

A alteração na expressão do *Insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF-1R) pode também constituir um mecanismo de resistência à terapêutica. Este recetor é também um recetor de tirosina-cinase e após a sua estimulação este inicia sinalizações intracelulares através das vias Ras/MAPK e PI3K/AKT estimulando o crescimento celular, a proliferação e a inibição da apoptose. As células que têm sobreexpressão de IGF-1R apresentam níveis significativamente baixos das proteínas p27 e p21 e um alto nível de atividade da cinase *Cyclin-dependent kinase 2* (CDK2). Isto indica que estas células têm a capacidade de impedir a paragem do ciclo celular mediada por fármacos como o Trastuzumab, contribuindo assim para a resistência a este fármaco (16,18).

Parece existir uma interação entre os recetores HER-2 e IGF-1R nas células resistentes ao Trastuzumab, sugerindo que a inibição da atividade da tirosina-cinase do IGF-1R pode levar à diminuição da fosforilação do HER-2, com consequente reaquisição da sensibilidade ao Trastuzumab (16).

- Sobreexpressão da tirosina-cinase c-MET

Em situações normais, o c-MET, recetor de tirosina-cinase codificado pelo proto-oncogene MET, expressa-se em células epiteliais e endoteliais. Após a sua ligação ao fator de crescimento de hepatócitos (o seu único ligando identificado) este dimeriza, sofre auto-fosforilação e ativa vias a jusante, nomeadamente a via MAPK e a via PI3K. Estas vias vão fazer a transdução do sinal e originar a transcrição de certos genes (16).

A sinalização da via do c-MET está ativamente envolvida na regeneração e desenvolvimento de vários órgãos. No entanto, no carcinoma da mama, parece existir uma sobreexpressão desta via, estando esta associada ao desenvolvimento de fenótipos mais invasivos com células com maior motilidade e capacidade de invasão. Assim sendo,

neste tipo de cancro a sobreexpressão desta via correlaciona-se com mau prognóstico (16).

Foi ainda demonstrado que o recetor c-MET interage fisicamente com o HER-2, sugerindo que a via MET tem ação sinérgica com a sinalização do HER-2 para conferir resistência ao Trastuzumab (16,18).

- Eritropoetina recombinante humana

A eritropoetina recombinante humana (rHuEPO) (frequentemente usada para controlar a anemia e a astenia causadas pela quimioterapia) parece antagonizar os efeitos do Trastuzumab e reduzir significativamente a inibição do crescimento celular induzida por este, sugerindo que o recetor da eritropoetina e o HER-2 podem estar sobreexpressos na mesma célula cancerígena. Adicionalmente, a rHuEPO parece ativar as vias PI3K/AKT e Src, levando à supressão dos efeitos do homólogo da fosfatase e da tensina (PTEN) e do Trastuzumab. Assim sendo, parece que a administração de rHuEPO contribui para a resistência ao Trastuzumab (18).

#### *Alterações intracelulares na sinalização a jusante do HER-2*

A nível intracelular os principais mecanismos de resistência são o défice de PTEN, as mutações ativadoras da PI3K, a ativação da Src e a presença de uma forma não-canónica de HER-2.

- Déficit de homólogo da fosfatase e da tensina

Um dos mecanismos envolvidos na resistência aos anti-HER-2 menos investigado é o défice de PTEN. Os pacientes com tumores com défice deste homólogo, parecem ter taxas de resposta global mais baixas ao Trastuzumab do que os pacientes sem esse défice (18).

- Mutações ativadoras da PI3K

Alguns estudos concluíram que as linhagens celulares de cancro de mama HER-2 positivas com mutações ativadoras do gene *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha* (PI3KCA), são mais resistentes ao Trastuzumab do que as linhagens HER-2 positivas sem estas mutações (16).

Parece ainda existir evidência de que os resultados de sobrevida dos pacientes com HER-2-positivo, podem ser influenciados pela alteração da via PI3K: a mutação no gene PI3KCA parece estar associada a piores resultados de sobrevida em pacientes com cancro da mama HER-2-positivo avançado (16).

Assim sendo, a ativação constitutiva da via PI3K/AKT (quer devido à perda de PTEN, quer devido a mutações do gene PI3KCA) está associada à resistência às terapêuticas dirigidas ao HER-2. A detecção da presença de mutações implicadas nesta via, é capaz de identificar um grupo de pacientes com mau prognóstico após terapêutica com Trastuzumab (16,18).

Por outro lado, e contrariamente ao referido acima, outros estudos mostram que nem a perda de PTEN, nem a mutação da PI3KCA, estão associados à taxa de resposta ao tratamento com Trastuzumab (16).

- Ativação da Src

O proto-oncogene Src codifica uma proteína de um recetor não tirosina-cinase, envolvida em processos celulares como a proliferação e a sobrevivência celular. Esta proteína tem uma grande interação com os recetores tirosina-cinase transmembranares, como o HER-2 (16).

A Src parece estar ativa em linhagens celulares de cancro de mama associadas à resistência primária e adquirida ao Trastuzumab. A nível molecular, a Src parece ser o mediador central de todas as vias de resistência (18). Assim sendo, a ativação da Src por si só é suficiente para conferir resistência aos fármacos anti-HER-2. Por este motivo, pacientes com esta ativação têm menor resposta à terapêutica e maior taxa de progressão da doença após terapêutica com fármacos anti-HER-2, relativamente a pacientes sem ativação da Src (16).

A inibição da Src pode reverter a resistência a este fármaco ao bloquear de forma eficaz a fosforilação da AKT e a sinalização a jusante do EGFR, mesmo em células com défice de PTEN (18).

- Presença de uma forma não canónica de HER-2

A existência de uma forma não canónica de HER-2 pode ser outro dos mecanismos de resistência. Esta forma está presente no núcleo da célula e atua como um

regulador da transcrição, modulando as respostas biológicas no cancro da mama. Esta forma de HER-2 parece ser um fator de mau prognóstico independente em pacientes com sobreexpressão membranar de HER-2. Atualmente ainda não existe nenhum fármaco para bloquear especificamente a expressão e/ou a função deste HER-2 nuclear (19).

### *Resposta imune diminuída*

Um dos mecanismos de ação do Trastuzumab é potenciar a identificação das células neoplásicas pelo sistema imunitário do doente.

O reconhecimento de células tumorais opsonizadas por anticorpos monoclonais, é mediado por recetores expressos nas células efectoras (monócitos, células dendríticas e granulócitos) e após o reconhecimento, estas induzem a destruição das células tumorais. As células dendríticas capturam os anticorpos monoclonais conjugados com antígenos tumorais sob a forma de complexos imunes. Estas são apresentadas aos linfócitos T citotóxicos e T auxiliares ativados, levando à estimulação e expansão das células B, originando-se uma resposta imune contra as células neoplásicas (16).

Adicionalmente, a presença de infiltrado linfocitário nos tumores parece estar associada a melhores respostas à terapêutica com Trastuzumab (16).

Assim sendo, a eficácia desta terapêutica parece depender da integridade e do bom funcionamento do sistema imunológico do hospedeiro e, por este motivo, respostas imunitárias mais fracas poderão estar associadas a menores taxas de resposta ao Trastuzumab (16).

Na Figura 22 encontram-se representados alguns destes mecanismos de resistência ao Trastuzumab.

## Caso clínico

S.S.C.L.L, paciente do sexo feminino, nascida a 10.09.1979, raça caucasiana, casada, natural e residente em Lisboa, Licenciada em Biotecnologia.

Relativamente à história médica da doente, destaca-se a presença de uma apendicectomia em 1984 e de uma adenoidectomia em 1989.

Na história ginecológica salienta-se a menarca aos 11 anos; GIPI, parto em 2010 com aleitamento materno durante 10 meses; e o facto da doente ser ainda menstruada à data do início da quimioterapia.

Trata-se de uma paciente sem comorbilidades e sem outros antecedentes pessoais ou familiares de relevo, sem história familiar de doença oncológica.

A história oncológica inicia-se em fevereiro de 2013 com a presença de empastamento mamário e corrimento hemático mamilar unilateral, do lado esquerdo, após expressão. Imagiologicamente, fez mamografia e ecografia mamária a fevereiro do mesmo ano onde se objetivou uma densificação irregular, que ocupava quase todo o quadrante superior externo da mama esquerda, com múltiplas microcalcificações pleomórficas. Adicionalmente observava-se ainda a presença de quatro a cinco adenopatias na axila do mesmo lado, a maior com cerca de 18 mm. Na mama direita havia apenas algumas microcalcificações não suspeitas.

Realizou também uma ressonância magnética nuclear (RMN) que objetivou a presença de uma condensação extensa, irregular e heterogénea, nos quadrantes externos da mama esquerda, com evidência de distorção trabecular, numa área de cerca de 6.8 x 2.9 cm, com extensão ao complexo areolo-mamilar. Na RMN estavam ainda presentes alguns focos periféricos, espessamento cutâneo e pelo menos 4 gânglios axilares esquerdos envolvidos.

Foi ainda realizada biópsia mamária que mostrou a presença de Carcinoma Intraductal (CID) grau 2, RE e RP negativos e fragmentos de tecido mamário com Carcinoma Ductal Invasivo (CDI), com RE negativo, RP positivo (60-70%) e HER-2 positivo (3+). Noutros fragmentos de tecido mamário existia ainda CDI, com RE positivo (70%), RP positivo (60%), HER-2 positivo (3+) e ki67 intermédio (35%). Na mesma

biópsia havia ainda fragmentos onde se observava a presença de mastopatia fibroquística e marcado infiltrado inflamatório de tipo linfocitário.

A citologia aspirativa ecoguiada do gânglio linfático da axila esquerda foi positiva para malignidade, consistente com metástase de carcinoma com padrão compatível com ponto de partida na mama.

Nesta altura, o estadiamento realizado com ecografia abdominal, radiografia de tórax e cintigrafia óssea, não mostrou evidência de metastização, sendo a doente estadiada como cT3N+M0.

Entre março e agosto de 2013 a doente fez tratamento neoadjuvante com Adriamicina e Ciclofosfamida, seguida de Docetaxel e Trastuzumab, obtendo-se uma boa resposta clínica. Em setembro do mesmo ano foi submetida a uma mastectomia radical modificada da mama esquerda, com boa resposta clínica. A análise da anatomia patológica da peça cirúrgica mostrou dois focos no quadrante ínfero-interno, com raras células isoladas de Carcinoma Invasivo (CI) da mama com alterações reativas à terapêutica (não se observando a presença de CI nos restantes quadrantes, particularmente no supero-externo onde se observava apenas uma área de fibrose); mostrou adicionalmente Carcinoma Ductal *In Situ* (CDIS) intraductal de alto grau, com necrose focal, presente em todos os quadrantes e cancerização dos ductos; documentou ainda linfangioses, mas ausência de invasões venosas ou peri-neurais. Adicionalmente, dos dez gânglios isolados, dois tinham micro-metástases. Conclui-se então ser um CI da mama, com resposta parcial à terapêutica neoadjuvante.

Entretanto, em outubro 2013, a doente iniciou terapêutica com Tamoxifeno e Goserelina e entre dezembro de 2013 e janeiro de 2014 realizou radioterapia. Esta última, foi realizada sobre a parede torácica esquerda, com uma dose de 50Gy em 25 frações de 2Gy ao longo de cinco semanas, com fotões de 6Mv, e bólus durante parte do tratamento. Foi ainda realizada radioterapia sobre a axila e a fossa supra-clavicular esquerdas, com dose de 50 Gy, em 25 frações de 2Gy, com fotões de 15 Mv, no mesmo período de tempo. A radioterapia foi bem tolerada, aparecendo, no entanto, hiperpigmentação na zona irradiada.



Em março de 2014 o resultado da análise dos genes *Breast Cancer Susceptibility Gene* (BRCA) 1 e 2 deu negativo, não havendo mutações clinicamente significativas nestes genes.

Em outubro de 2014 a doente teve uma recidiva que se apresentou sob a forma de uma placa eritematosa na zona da cicatriz da mastectomia (metástase cutânea de carcinoma da mama) - mais especificamente sob a forma de Linfagite Carcinomatosa. O perfil imunohistoquímico das células tumorais desta lesão tinha RE negativo, RP positivo (com marcação nuclear de intensidade ligeira a moderada em cerca de 90% das células), HER-2 positivo (3+), p53 positivo e ki67 elevado.

Nesta altura detetou-se ainda uma adenopatia axilar direita, que após biópsia ecoguiada, se verificou corresponder a uma metástase de carcinoma com a seguinte caracterização: RE negativo, RP negativo (inferior a 5%), HER-2 positivo (3+) e p53 positivo.

Assim sendo, em novembro de 2014 a doente iniciou Trastuzumab-Emtansine (TDM-1) com resposta cutânea aparentemente completa, com desaparecimento dos sinais inflamatórios cutâneos.

Em março de 2015 a doente realizou uma Tomografia por Emissão de Positrões (PET) que mostrava ausência de doença e resposta completa. No entanto, em julho do mesmo ano, houve novamente progressão da doença com o aparecimento de uma lesão macular ligeiramente eritematosa, com cerca de 3 mm. A biópsia da lesão realizada em setembro confirmou tratar-se de metastização cutânea caracterizada por: RE negativo, RP fraco (10% das células), HER-2 positivo (3+), p53 positivo e ki67 50%.

Por este motivo, em outubro a doente inicia terapêutica com Pertuzumab, Trastuzumab e Vinorelbina.

Em fevereiro de 2016 há novamente progressão da doença com o aparecimento de uma lesão eritematosa com cerca de 3 cm, abaixo da cicatriz. Por este motivo, no mês seguinte foi feita cirurgia de limpeza, tendo sido removido um retalho com 7.5 x 6 x 2 cm com margens cirúrgicas livres de tumor (a análise anatomo-patológica verificou tratar-se de uma linfangiose carcinomatosa da derme, sendo caracterizada por RE fraco (5% das células), RP forte (50% das células), HER-2 positivo (3+), P53 positivo e ki67 50%). Nesta altura manteve a mesma terapêutica iniciada em outubro de 2015.

Em abril de 2016 há o aparecimento de um novo empastamento, desta vez no quadrante superior externo da mama direita. Foi realizada PET que mostrou um gânglio suspeito e uma lesão no quadrante superior-externo desta mama. A doente foi então submetida a uma mastectomia simples da mama direita, em maio do mesmo ano. A análise anátomo-patológica da peça revelou uma lesão com dimensões de 4.3 x 2.3 x 3.4 cm; CI da mama com diferenciação apócrina (20%) grau 2 de malignidade histológica e linfagioses carcinomatosas (80%), RE negativo (<5%), RP negativo (<5%), HER-2 positivo (3+), p53 positivo, ki67 50% e recetor de androgénios forte (100%). Foram ainda retirados 4 gânglios axilares, sendo um deles positivo.

A junho de 2016 houve novamente progressão da doença com progressão cutânea para a parede torácica esquerda, com o aparecimento de uma lesão supracilicatricial com cerca de 30 x 20 mm. A doente foi então submetida a eletroquimioterapia local sobre as lesões, no Instituto Português de Oncologia, em julho, mantendo a terapêutica com Pertuzumab e Trastuzumab.

Em agosto de 2016 verificou-se novamente progressão da lesão cutânea, com aumento das manchas pré-existentes e aparecimento de novas manchas. Nesta altura, a PET e a Tomografia Computorizada (TC) realizadas evidenciaram progressão da doença também a nível ganglionar, com a presença de alguns pequenos gânglios na axila direita (com o gânglio dominante a medir cerca de 17 x 13 mm).

Em setembro de 2016, a doente entrou no ensaio SOPHIA (ensaio randomizado de fase 3 para doentes com cancro da mama metastático HER-2 positivo, com terapêutica prévia com dois fármacos anti-HER-2, que compara a terapêutica de Margetuximab + QT com Trastuzumab + QT) e iniciou terapêutica com Capecitabina e Margetuximab (fármaco em estudo), mostrando em dezembro do mesmo ano remissão da lesão cutânea, e diminuição das dimensões do gânglio para 8 x 5 mm. Ainda durante o período em que a doente esteve no ensaio, houve desaparecimento total das manchas.

Sob a terapêutica acima referida, em janeiro de 2017 verificou-se o aparecimento de uma nova lesão cutânea na parede torácica esquerda. Esta lesão caracterizava-se pela presença de linfangioses carcinomatosas, com RE e RP negativos, HER-2 positivo (3+), P53 positivo e ki67 95%. Nesta altura, por progressão da doença, a doente foi retirada do ensaio já referido.

Ainda em janeiro a doente inicia terapêutica com Lapatinib e Capecitabina.

Em fevereiro de 2017, uma TC realizada mostrou a presença de 3 gânglios suspeitos na região axilar direita, o maior com 10 x 8 mm – gânglio já identificado em exames anteriores, e que até à avaliação prévia, estava aparentemente a diminuir de dimensões, mas que nesta avaliação mostrava progressão da doença, por apresentar um volume mais aumentado.

Nesta altura, foi feita a análise genética tumoral pelo teste *FoundationOne*<sup>®</sup> CDx, que identificou a presença de três alterações genéticas: amplificação do HER-2; PI3KR1–Q155\_F465>H e TP53 – V216M. A doente iniciou então bloqueio duplo com Lapatinib e Trastuzumab mas sem resposta a este tratamento. No entanto, com a reintrodução de Capecitabina obteve-se resposta parcial e a doença estabilizou.

Em dezembro de 2017 há o aparecimento de uma nova mancha na parede torácica do lado esquerdo. A doente fez TC toraco-abdomino-pélvia que não detetou doença em nenhum local. A lesão foi tendo um crescimento progressivo lento até março de 2018, tendo a doente iniciado em abril desse ano terapêutica com Cisplatina e Trastuzumab. Sob esta terapêutica, a doente teve queixas de emese grau 2 de CTCEA V5 (21) e pouca resposta terapêutica aparente.

Em janeiro de 2018 a TC toraco-abdomino-pélvica relatava aspetos sobreponíveis ao exame anterior. Assim sendo, a doente encontrava-se com progressão da doença a nível cutâneo, mas aparentemente sem doença sistémica noutros locais.

Em julho de 2018 a doente recorreu a uma consulta no *Lombardi Center em Georgetown University - Washington* e ao *National Institute of Health* onde ficou medicada com Lapatinib, Everolimus e Exemestano, com diminuição das lesões da pele em cerca de duas semanas. Com esta terapêutica a doente apresentou efeitos secundários subtis toleráveis (mucosite oral grau 1 e rash cutâneo grau 1 de CTCEA) (21).

A TC de janeiro de 2019 refletia um ligeiro aumento de dimensões do gânglio axilar direito mantido em vigilância, medindo à data 11 x 8 mm.

Em abril de 2019 a doente tem novamente progressão da doença cutânea na zona cicatricial do lado esquerdo. Neste mesmo mês, a doente fez colheita de sangue para o estudo de iniciativa de investigador (Investigador Principal Dr. Luís Costa)

*Oncodynamics*. Neste estudo as doentes com cancro da mama metastático realizam colheitas de sangue antes de iniciar o tratamento, em cada avaliação objetiva (ou a cada 12 a 16 semanas) e até dois episódios consecutivos de progressão. Tem como objetivo avaliar a progressão tumoral, por meio da avaliação da heterogeneidade da progressão clonal, das interações entre o tumor e o hospedeiro e da resposta imune do doente.

Ainda em abril do mesmo ano, a doente iniciou terapêutica com Fulvestrant.

Em junho de 2019, através do *Managed Access Program* da indústria farmacêutica *Novartis*, a doente irá iniciar terapêutica com Alpelisib (inibidor da via PI3K), não havendo até à data mais informações dignas de registo.

Na Figura 1 podemos observar de forma esquemática as datas e o tipo de recidiva que a doente teve ao longo do decurso da sua doença, assim como a caracterização anatomo-patológica presente em cada momento da doença. Na Figura 2 encontram-se esquematizadas as diferentes terapêuticas farmacológicas realizadas e o momento em que foram introduzidas.

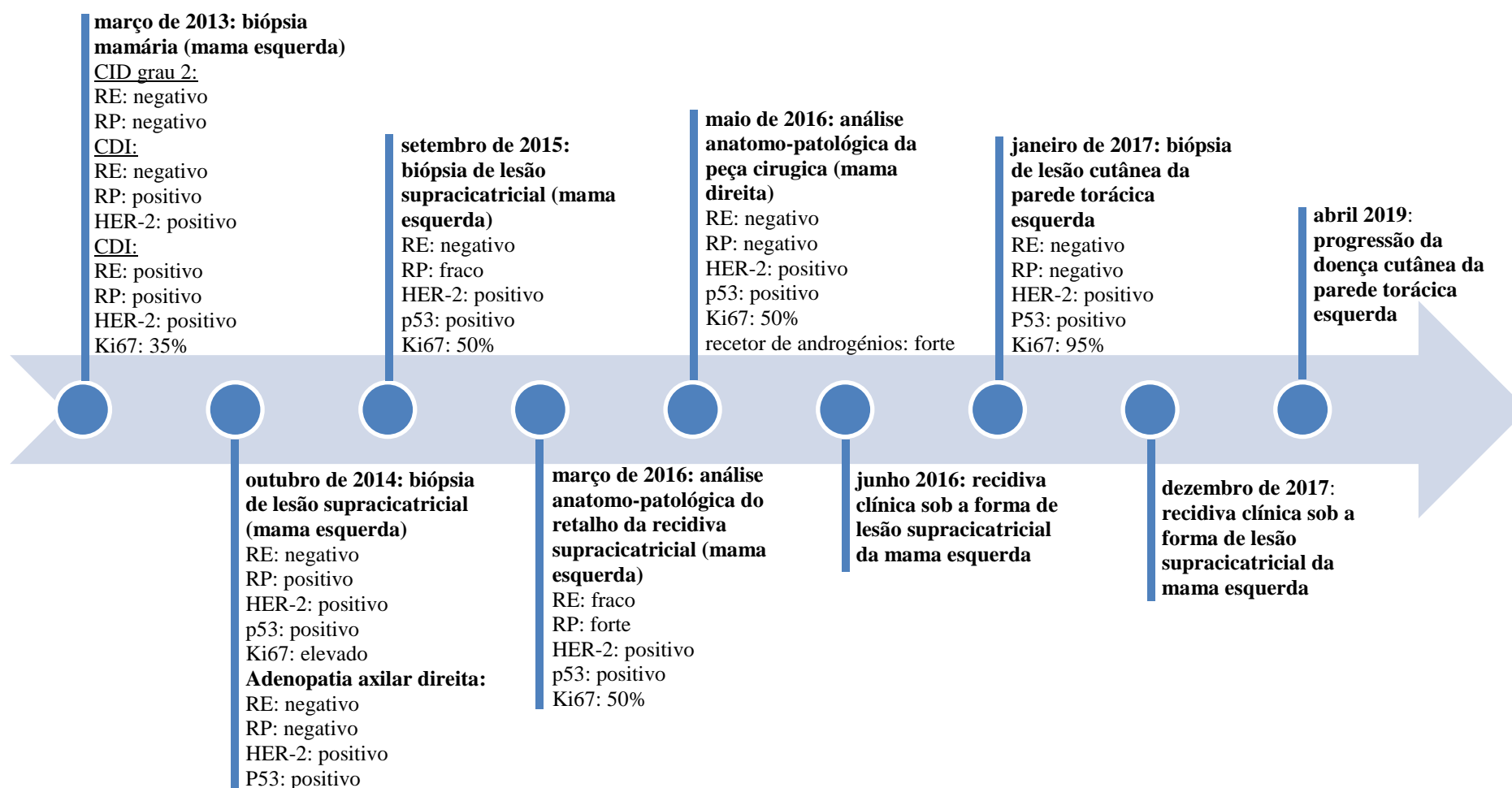


Figura 1

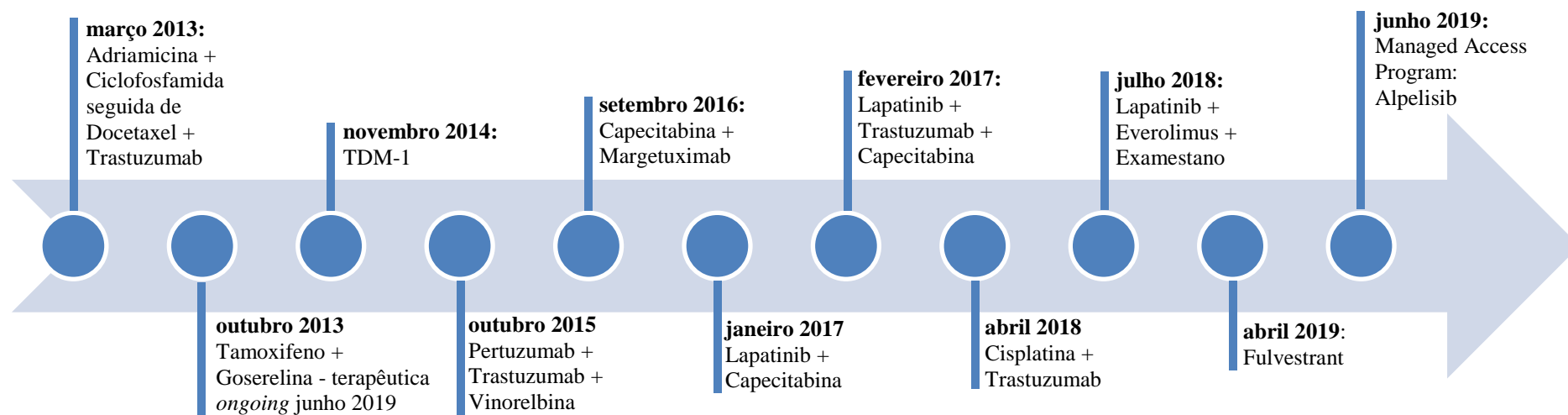


Figura 2

## Discussão

A prevalência das neoplasias é cada vez maior, sendo que na mulher o cancro da mama é a neoplasia mais frequente e a principal causa de morte de etiologia neoplásica (1-3,7).

A título singular, o estudo do caso apresentado ilustra a heterogeneidade e a capacidade evolutiva das células tumorais e permite-nos ainda analisar de que forma novas técnicas e novas descobertas, podem ser relevantes para a abordagem destes doentes.

A doente do caso clínico apresentava um cancro da mama inicialmente Luminal B HER-2 positivo que, com a evolução da doença, se tornou resistente à hormonoterapia, dando origem a um subtipo HER-2 positivo biologicamente mais agressivo. Há a destacar que a doente se incluía então nos cerca de 15-30% dos casos de cancro da mama com sobreexpressão de HER-2 (15,18,19). Adicionalmente, este caso enquadra-se nos cerca de 40-60% de casos referidos na bibliografia, em que os pacientes com cancro da mama metastático HER-2 positivo não respondem ao tratamento com fármacos anti-HER-2 (19).

Na abordagem desta doente foram utilizadas diversas terapêuticas aprovadas para o cancro da mama (nomeadamente cirurgia, radioterapia, hormonoterapia, quimioterapia e terapêutica alvo) (7,20).

A progressão da doença que ocorreu neste caso faz-nos perceber que, apesar dos marcadores avaliados por imunohistoquímica ou hibridização *in situ* nos direcionarem para uma terapêutica preferencial, existem outras alterações (apenas detetadas com a análise genética) que predizem diferentes respostas a uma mesma terapêutica. Este achado parece confirmar a ideia documentada na literatura de que, muitos pacientes com doença avançada, após a sequenciação de nova geração, tem opções adicionais de tratamento com base nos perfis genéticos das suas neoplasias (6,8).

Assim sendo, no caso apresentado, a análise genética permitiu perceber a razão pela qual o tumor se mantinha resistente e com capacidade de provocar progressão da doença, apesar da terapêutica dirigida contra o HER-2. Após a análise efetuada pela *FoundationOne*® *CDx* confirmou-se que o tumor mantinha a amplificação do HER-2 e a

perda de função do supressor tumoral p53, características estas já conhecidas previamente por outros métodos mas que, pelo facto de ainda se manterem presentes, nos permitem aferir que estes genes são possíveis alvos terapêuticos caso surja algum outro fármaco passível de ser utilizado.

Ainda na análise da *FoundationOne*<sup>®</sup> *CDx*, verificou-se a existência de uma mutação ativadora da via PI3K, que conferia resistência através da sinalização a jusante do HER-2, mecanismo este caracterizado na literatura atual (16,18).

Há ainda a referir que, por ter alterações no p53 e na via PI3K, a doente tinha então no seu CGP duas das alterações referidas na literatura como sendo das mais frequentemente identificadas nas amostras tumorais perfiladas (6).

Embora não conste ainda nas aprovações europeias nenhum fármaco aprovado para o tratamento do cancro da mama, cujo alvo seja a inativação da via PI3K, a descoberta desta alteração permitiu que, aquando do aparecimento de um novo fármaco com potencial ação nesta via, a doente pudesse ser proposta para o uso *off-label* deste fármaco através do *Managed Access Program*, da indústria farmacêutica *Novartis*. Assim sendo, após terapêutica com diversos fármacos de QT, HT e terapêutica alvo, irá agora ser tentada terapêutica com Alpelisib, um fármaco ainda em estudo e que se destina a inibir a via PI3K.

Podemos então concluir que a doente do caso clínico se encontra nos cerca de 93% de doentes, referidos na literatura, em que a realização de CGP indica alterações genéticas com potenciais opções de tratamento (6).

Deste modo, a caracterização genética das células tumorais desta doente permitiu verificar que a doente apresentava a via já referida alterada e este achado modificou a abordagem terapêutica da doente, permitindo a escolha de novos fármacos capazes de interferir com esta alteração.

Os estudos feitos nesta área referem, no entanto, que mesmo quando os pacientes recebem uma terapêutica dirigida à alteração genética detetada no CGP, apenas uma pequena parte (cerca de 2-8%) tem algum benefício da aplicação desta medida (6). Relativamente a este tópico, devido ao facto da doente só ir iniciar agora a terapêutica dirigida à via PI3K, ainda não é possível tirar conclusões acerca do benefício a nível dos *outcomes* com esta intervenção.



Adicionalmente, a doente encontra-se ainda inserida no estudo *Oncodynamics*. De entre os vários métodos utilizados neste estudo, destaca-se a utilização de biópsias líquidas como meio de avaliar a heterogeneidade da progressão clonal, que pode refletir a progressão da doença. Tal como documentado na literatura (5,10–12), estas biópsias líquidas têm como objetivo analisar partículas de ctDNA, de forma a ser possível caracterizar a heterogeneidade tumoral em cada momento da doença. Assim sendo, a realização de biópsias líquidas sucessivas nesta doente, poderá permitir que se identifiquem novas mutações que possam surgir ao longo da progressão da doença e que por esse motivo se possam tornar novos potenciais alvos terapêuticos.

Nesta doente em particular, podem ser pensadas outras alternativas caso a terapêutica que irá ser agora iniciada não resulte. Quando utilizamos uma plataforma de pesquisa de ensaios clínicos (22), apercebemo-nos que utilizando os filtros *HER-2 positive, recruiting studies, interventional studies, breast cancer stage IV, studies with female participants e 40 years*, existem 36 opções de estudos possíveis (pesquisa realizada a 15 de junho de 2019).

Pesquisando com as condições *p53, recruiting studies, breast cancer stage IV, studies with female participants e 40 years*, existem outros 3 ensaios disponíveis. E quando escolhemos as opções *PI3K, recruiting studies, breast cancer Stage IV, studies with female participants e 40 years*, aparecem-nos 16 opções (pesquisas realizadas a 15 de junho de 2019).

No entanto, de entre todas as opções de ensaios apresentadas, apenas o ensaio *MCLA-128 With Trastuzumab/Chemotherapy in HER2+ and With Endocrine Therapy in ER+ and Low HER2 Breast Cancer*, está a recrutar doentes em Portugal.

Na Figura 23, na Figura 24 e na Figura 25, encontram-se os resultados destas pesquisas sob a forma de listagem dos ensaios onde será possível incluir esta doente, caso estas alterações genéticas se mantenham.

Assim sendo, no futuro, quanto maior for o conhecimento acerca da genética de cada tumor, melhor e mais correta será a abordagem terapêutica que podemos proporcionar aos doentes. Sendo o cancro da mama uma neoplasia tão frequente e com um número absoluto de óbitos tão elevado, as alterações na sua abordagem terão grande impacto a nível global.

Por conseguinte, a caracterização genética tumoral no cancro da mama, parece ter importância na abordagem clínica tanto a nível individual (pois pode alterar o curso da doença de cada indivíduo em particular) como a nível global, dada a sua grande prevalência. No entanto, não é conclusivo se esta alteração na abordagem terapêutica se reflete numa alteração do curso da doença e numa melhoria dos *outcomes*.

Como perspetivas para o futuro, seria importante perceber melhor a variabilidade fisiológica e a cinética da *clearance* do cfDNA e do ctDNA, assim como perceber de que maneira estas se correlacionam com as características biológicas do tumor. Seria também importante perceber qual o impacto da carga metabólica do tumor na deteção correta das alterações genéticas, quando se realizam biópsias líquidas nos doentes com cancro. Por outro lado, seria também conveniente para a abordagem clínica caracterizar a fração de tumores que liberta níveis detetáveis de ctDNA, por tipo tumoral e por estadio.

Tendo em conta que a atividade de uma terapêutica alvo direcionada a uma mutação particular pode ser diferente entre diferentes tipos de tumores com a mesma mutação (6), seria importante estudar melhor este aspeto e determinar de que forma estas alterações podem ser *drivers* de cada subtipo tumoral.

Adicionalmente seria necessário aprofundar o estudo sobre as vias de resistência ao Trastuzumab e desenvolver técnicas capazes de nos predizer a resposta de cada paciente a esta terapêutica (nomeadamente a nível de identificação de mais mutações implicadas nos mecanismos de resistência).

Relativamente a terapêuticas, novas investigações sobre formas de bloquear ou neutralizar as ações da proteína Src, teriam grande importância neste tipo de doentes, visto que tal como relatado em diversos estudos, esta proteína tem um importante papel na sinalização a jusante da via do HER-2 (18).

## Conclusão

Quanto mais abrangente e esclarecedor for o conhecimento acerca do perfil tumoral de cada neoplasia em particular, maior será a possibilidade de compreender os mecanismos subjacentes à gênese e progressão da doença oncológica.

Com base neste caso, podemos concluir que a análise genética do perfil tumoral, poderá ser um fator adicional e de grande relevância na abordagem ao doente oncológico, na medida em que nos fornece informações significativas que alteram a nossa abordagem e melhoram os cuidados prestados ao doente. No entanto, ainda não é conclusivo se esta alteração na abordagem ao doente é benéfica a nível do prognóstico de cada paciente em particular.

## Agradecimentos

Durante o meu percurso na Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, várias vezes me disseram que um curso não se faz sozinho, por isso, neste trabalho agradeço:

À Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, pela oportunidade que me deu de me poder formar na profissão que eu escolhi.

À minha orientadora Dra. Maria Rita Dionísio Abreu, pela disponibilidade e pelo apoio ao longo da realização deste trabalho.

A todos os professores e tutores com quem me cruzei por me terem inculcido o gosto pelo conhecimento e todos me terem ajudado a construir o meu caminho.

A todos os amigos que me acompanharam e que tiveram sempre uma palavra de incentivo e uma mão pronta a ajudar.

Ao meu tio João e ao Sr. Vítor, que durante este percurso nos deixaram.

Ao meu namorado por toda a paciência, o apoio e a dedicação. Por estar presente e ser tantas vezes o suporte que preciso.

À minha família por me dar força para tentar chegar sempre mais longe.

À minha irmã por ser a boa disposição, a descontração e a positividade que a mim me faltam.

Aos meus pais, por desde sempre acreditarem em mim e lutarem para que eu conseguisse tudo o que sonhei. Pelo apoio, pela paciência e por aceitarem a minha ausência nos momentos em que a faculdade me exigia mais tempo.

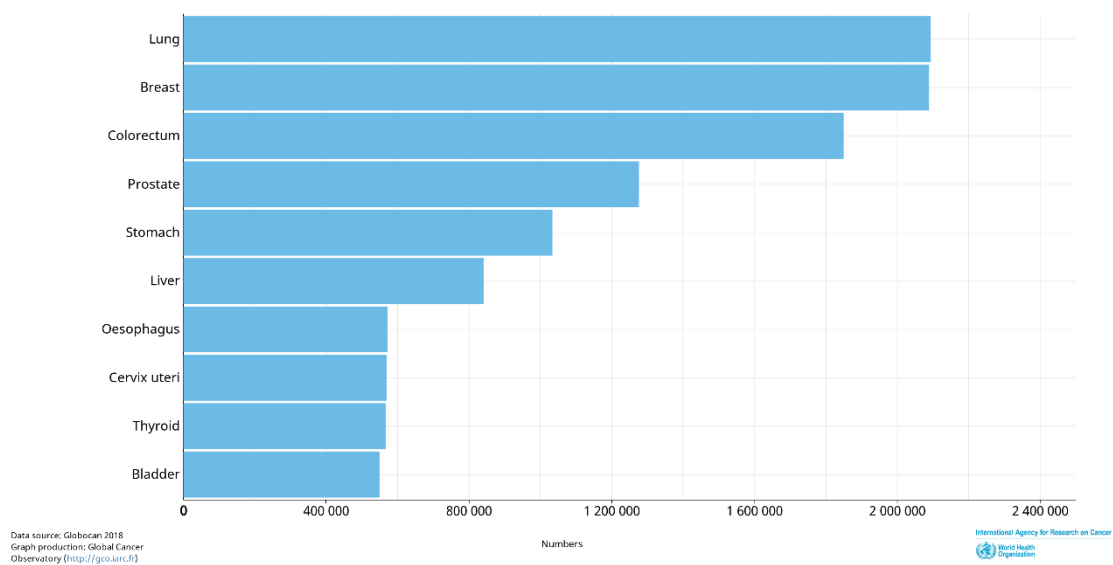
Um obrigada especial a cada um por terem deixado uma marca na minha vida e no meu caminho.

## Bibliografia

1. Worldwide cancer statistics | Cancer Research UK [Internet]. [cited 2019 Jan 7]. Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer#heading-Zero>
2. Global cancer data by country | World Cancer Research Fund [Internet]. [cited 2019 Jan 7]. Available from: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/data-cancer-frequency-country>
3. Global Cancer Observatory [Internet]. [cited 2018 Dec 29]. Available from: <http://gco.iarc.fr/>
4. RORENO. Registo Oncológico Nacional 2010 Elaborado pelo Registo Oncológico Regional do Norte Editado pelo Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil – EPE. 2016; Available from: [http://www.roreno.com.pt/images/stories/pdfs/ro\\_nacional\\_2010.pdf](http://www.roreno.com.pt/images/stories/pdfs/ro_nacional_2010.pdf)
5. Aravanis AM, Lee M, Klausner RD. Next-Generation Sequencing of Circulating Tumor DNA for Early Cancer Detection. *Cell*. 2017;168(4):571–4.
6. Hilal T, Nakazawa M, Hodskins J, Villano JL, Mathew A, Goel G, et al. Comprehensive genomic profiling in routine clinical practice leads to a low rate of benefit from genotype-directed therapy. *BMC Cancer*. 2017;2:1–8.
7. Senkus E, Kyriakides S, Ohno O, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer : ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis , treatment and follow-up †. *Ann Oncol*. 2015;26(Supplement 5).
8. Johnson DB, Dahlman KH, Knol J, Gilbert J, Puzanov I, Means-Powell J, et al. Enabling a Genetically Informed Approach to Cancer Medicine: A Retrospective Evaluation of the Impact of Comprehensive Tumor Profiling Using a Targeted Next-Generation Sequencing Panel. *Oncologist*. 2014;19(6):616–22.
9. Yohe S, Thyagarajan B. Review of clinical next-generation sequencing. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(11):1544–57.

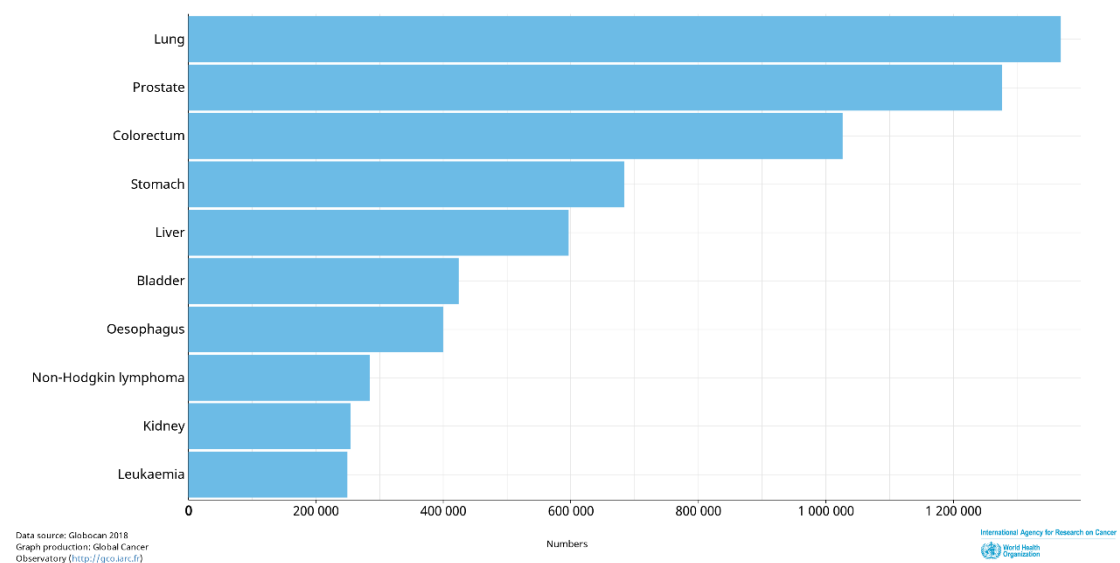
10. Zhou C, Yuan Z, Ma W, Qi L, Mahavongtrakul A, Li Y, et al. Clinical utility of tumor genomic profiling in patients with high plasma circulating tumor DNA burden or metabolically active tumors. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):1–13.
11. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014;32(6):579–86.
12. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6(224 224ra24):1–10.
13. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(4):223–38.
14. A World-Leading Molecular Insights Company | Foundation Medicine [Internet]. [cited 2019 Jan 8]. Available from: <https://www.foundationmedicine.com/>
15. Samadi P, Saki S, Dermani FK, Pourjafar M, Saidijam M. Emerging ways to treat breast cancer: will promises be met? *Cell Oncol*. 2018;41(6):605–21.
16. Gagliato DDM, Leonardo D, Jardim F, Pereira MS, Hortobagyi GN. Mechanisms of resistance and sensitivity to anti-HER2 therapies in HER2+ breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(39).
17. Programa nacional para as doenças oncológicas 2017. 2017;
18. Vu T, Claret FX. Trastuzumab : updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front Oncol*. 2012;2(62):1–7.
19. Russo RIC, Chervo MF, Madera S, Charreau EH, Elizalde P V. Nuclear ErbB-2 : a Novel Therapeutic Target in ErbB-2-Positive Breast Cancer ? *Horm Cancer*. 2019;
20. Meisel JL, Venur VA, Gnant M, Carey L. Evolution of Targeted Therapy in Breast Cancer: Where Precision Medicine Began. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2018;(38):78–86.

21. Cancer Institute N. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v5.0 [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 16]. Available from: <https://www.meddra.org/>
22. Home - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2019 Jun 15]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/>

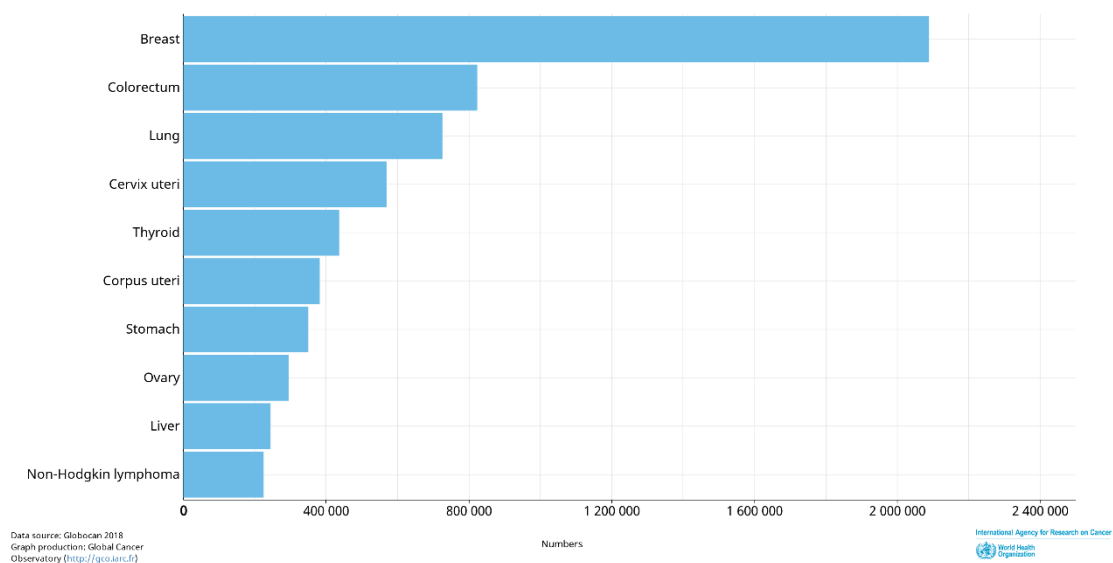


*Figura 3*

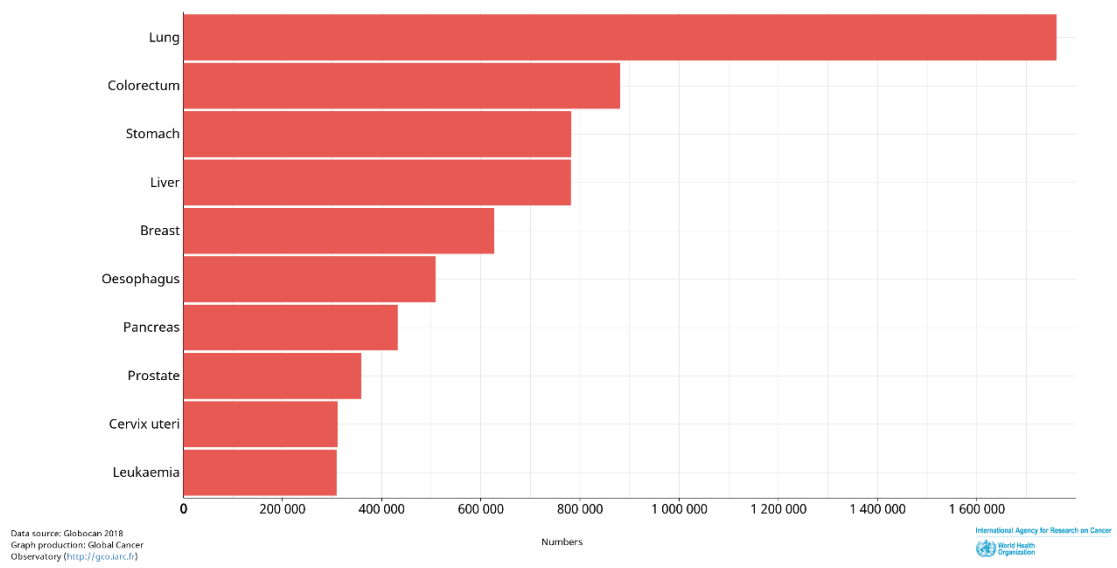




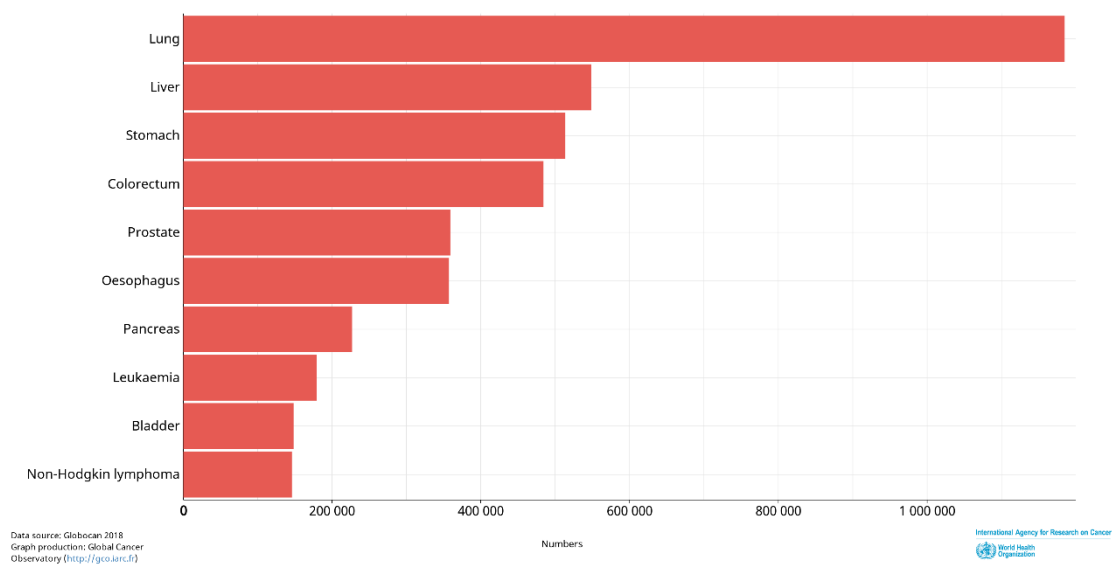
*Figura 4*



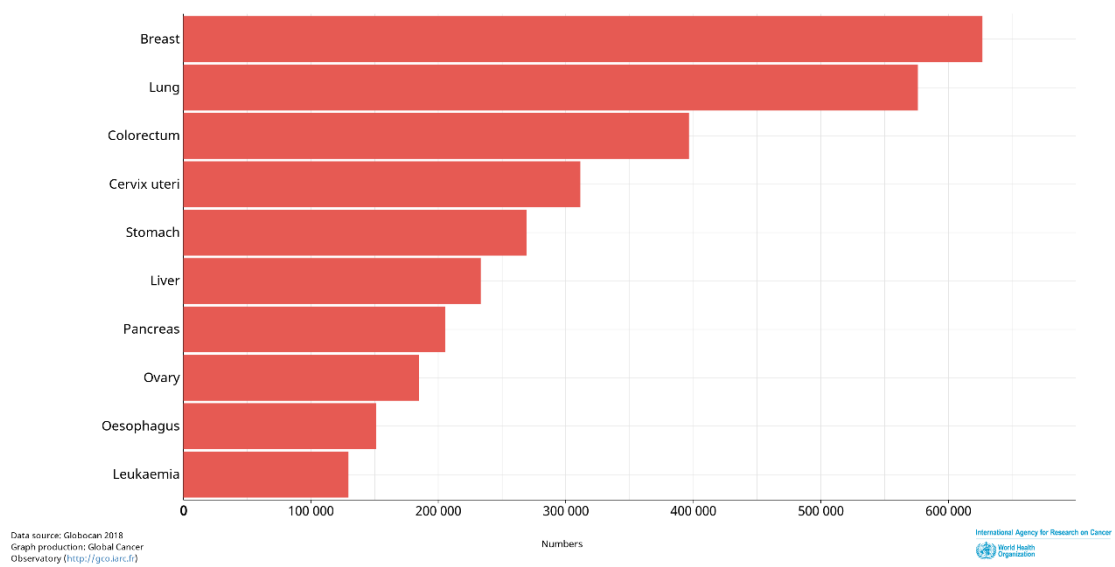
*Figura 5*



*Figura 6*



*Figura 7*



*Figura 8*

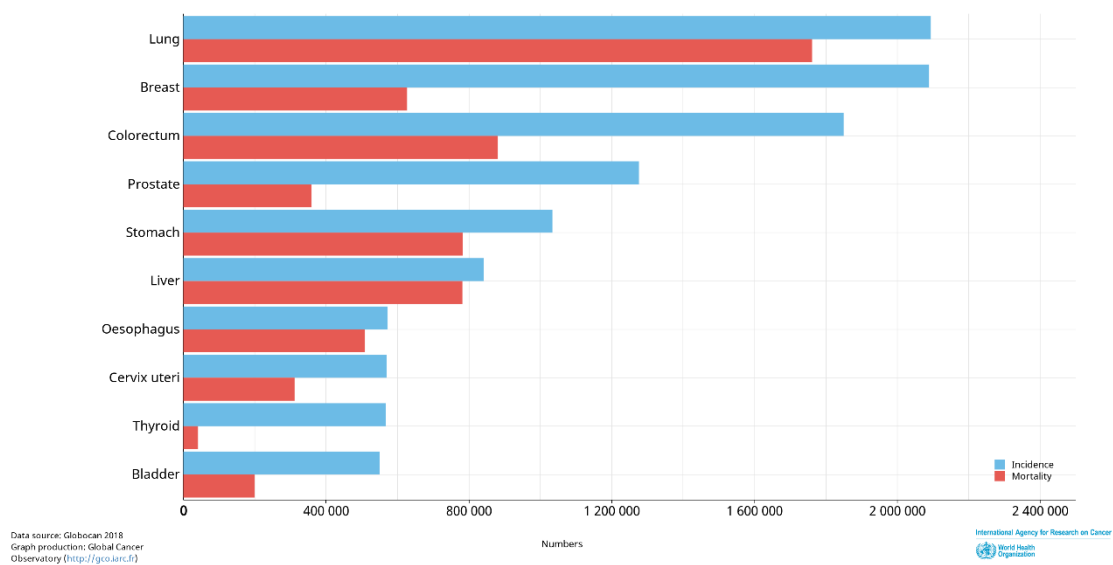


Figura 9

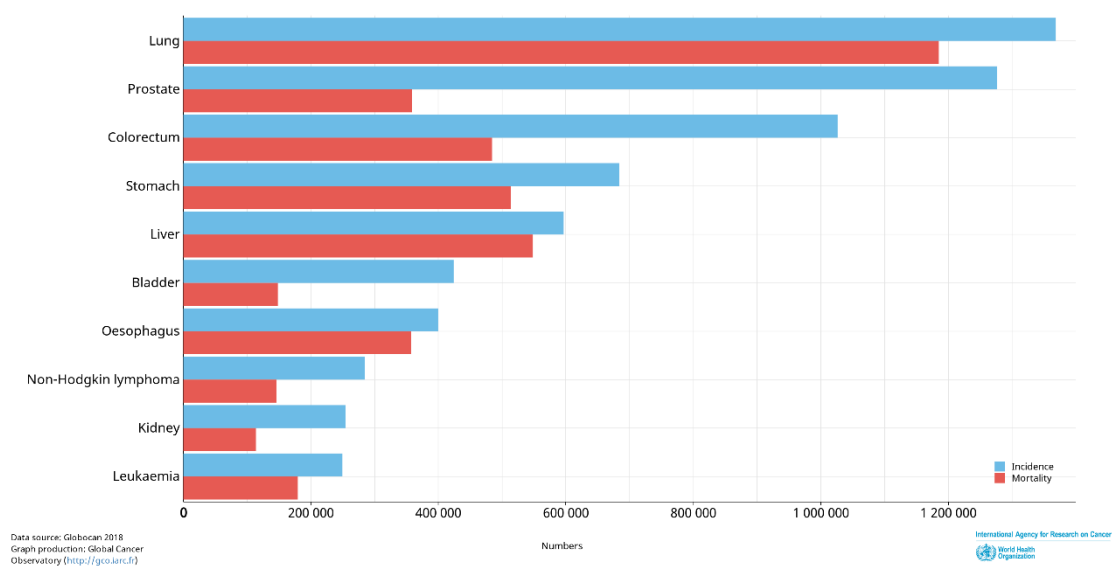
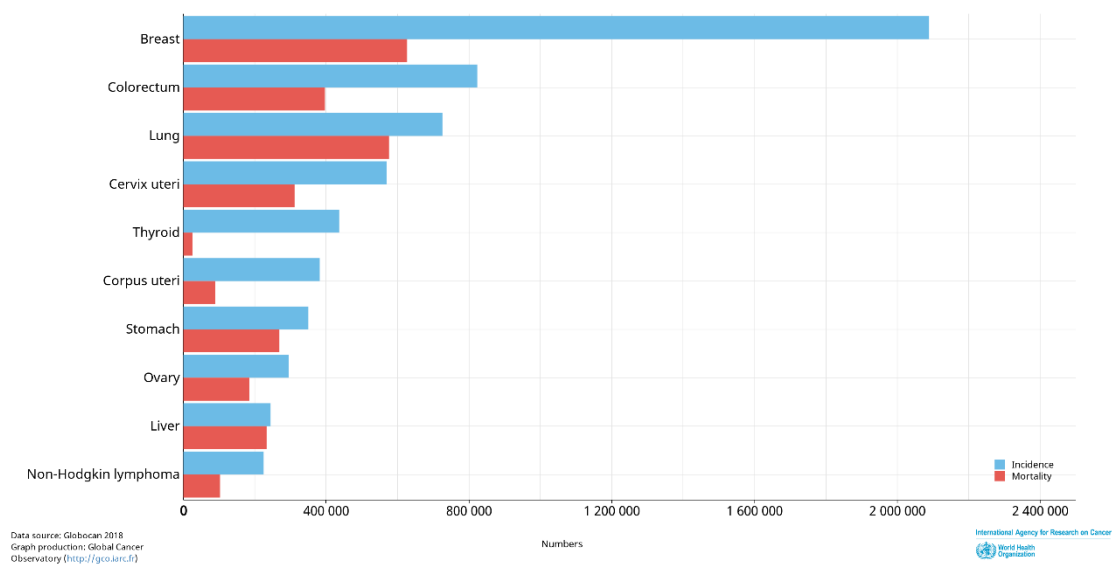


Figura 10



*Figura 11*



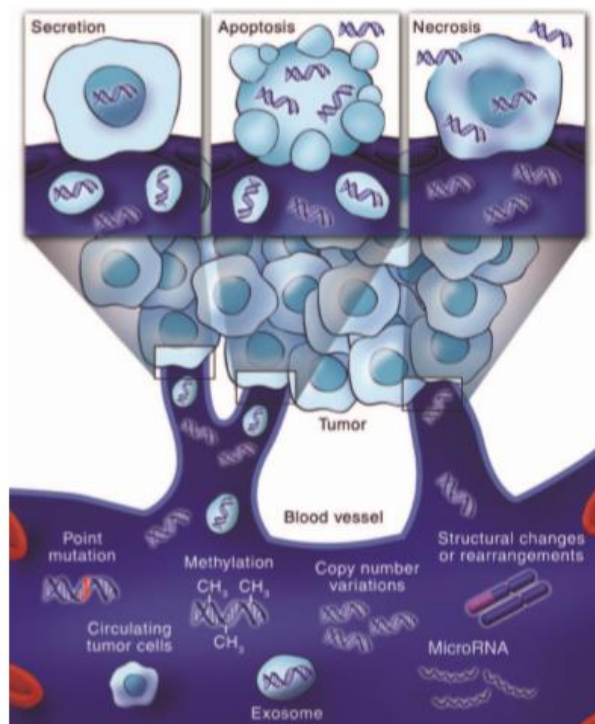


Figura 12

Indication	Biomarker	Therapy
Non-small cell lung cancer (NSCLC)	<i>EGFR</i> exon 19 deletions and <i>EGFR</i> exon 21 L858R alterations	Gilotrif® (afatinib), Iressa® (gefitinib), or Tarceva® (erlotinib)
	<i>EGFR</i> exon 20 T790M alterations	Tagrisso® (osimertinib)
	<i>ALK</i> rearrangements	Alecensa® (alectinib), XALKori® (crizotinib), or Zykadia® (ceritinib)
	<i>BRAF</i> V600E	Tafinlar® (dabrafenib) in combination with Mekinist® (trametinib)
Melanoma	<i>BRAF</i> V600E	Tafinlar® (dabrafenib) or Zelboraf® (vemurafenib)
	<i>BRAF</i> V600E or V600K	Mekinist® (trametinib) or Cotellic® (cobimetinib) in combination with Zelboraf® (vemurafenib)
Breast cancer	<i>ERBB2</i> (HER2) amplification	Herceptin® (trastuzumab), Kadcyla® (ado-trastuzumab-emtansine), or Perjeta® (pertuzumab)
Colorectal cancer	<i>KRAS</i> wild-type (absence of mutations in codons 12 and 13)	Erbix® (cetuximab)
	<i>KRAS</i> wild-type (absence of mutations in exons 2, 3, and 4) and <i>NRAS</i> wild type (absence of mutations in exons 2, 3, and 4)	Vectibix® (panitumumab)
Ovarian cancer	<i>BRCA1/2</i> alterations	Rubraca® (rucaparib)

Figura 13

ABL1	ACVR1B	AKT1	AKT2	AKT3	ALK	ALOX12B	AMER1 (FAM123B)	APC
AR	ARAF	ARFRP1	ARID1A	ASXL1	ATM	ATR	ATRX	AURKA
AURKB	AXIN1	AXL	BAP1	BARD1	BCL2	BCL2L1	BCL2L2	BCL6
BCOR	BCORL1	BRAF	BRCA1	BRCA2	BRD4	BRIPI	BTG1	BTG2
BTB	C11orf30 (EMSY)	CALR	CARD11	CASP8	CBFB	CBL	CCND1	CCND2
CCND3	CCNE1	CD22	CD274 (PD-L1)	CD70	CD79A	CD79B	CDC73	CDH1
CDK12	CDK4	CDK6	CDKB	CDKN1A	CDKN1B	CDKN2A	CDKN2B	CDKN2C
CEBPA	CHEK1	CHEK2	CIC	CREBBP	CRKL	C5FIR	C5F3R	CTCF
CTNNA1	CTNNA1	CUL3	CUL4A	CXCR4	CYP17A1	DAXX	DDR1	DDR2
DIS3	DNMT3A	DOT1L	EED	EGFR	EP300	EPHA3	EPHB1	EPHB4
ERBB2	ERBB3	ERBB4	ERCC4	ERG	ERRF1	ESR1	EZH2	FAM46C
FANCA	FANCC	FANCG	FANCL	FA5	FBXW7	FGF10	FGF12	FGF14
FGF19	FGF23	FGF3	FGF4	FGF6	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGFR4
FH	FLCN	FLT1	FLT3	FOXL2	FUBP1	GABRA6	GATA3	GATA4
GATA6	GID4 (C17orf39)	GNAI1	GNAI3	GNAQ	GNAS	GRM3	GSK3B	H3F3A
HDAC1	HGF	HNF1A	HRAS	HSD3B1	ID3	IDH1	IDH2	IGF1R
IKBKE	IKZF1	INPP4B	IRF2	IRF4	IRS2	JAK1	JAK2	JAK3
JUN	KDM5A	KDM5C	KDM6A	KDR	KEAP1	KEL	KIT	KLHL6
KMT2A (MLL)	KMT2D (MLL2)	KRAS	LTK	LYN	MAF	MAP2K1 (MEK1)	MAP2K2 (MEK2)	MAP2K4
MAP3K1	MAP3K13	MAPK1	MCL1	MDM2	MDM4	MED12	MEF2B	MEN1
MERTK	MET	MITF	MKNK1	MLH1	MPL	MRE11A	MSH2	MSH3
MSH6	MST1R	MTAP	MTOR	MUTYH	MYC	MYCL (MYCL1)	MYCN	MYD88
NBN	NF1	NF2	NFE2L2	NFKB1A	NKX2-1	NOTCH1	NOTCH2	NOTCH3
NPM1	NRAS	NTSC2	NTRK1	NTRK2	NTRK3	P2RY8	PALB2	PARK2
PARP1	PARP2	PARP3	PAX5	PBRM1	PDCD1 (PD-1)	PDCD1LG2 (PD-L2)		PDGFRA
PDGFRB	PDK1	PIK3C2B	PIK3C2G	PIK3CA	PIK3CB	PIK3R1	PIM1	PMS2
POLD1	POLE	PPARG	PPP2R1A	PPP2R2A	PRDM1	PRKAR1A	PRKC1	PTCH1
PTEN	PTPN11	PTPRO	QKI	RAC1	RAD21	RAD51	RAD51B	RAD51C
RAD51D	RAD52	RAD54L	RAF1	RARA	RB1	RBM10	REL	RET
RICTOR	RNF43	ROS1	RPTOR	SDHA	SDHB	SDHC	SDHD	SETD2
SF3B1	SGK1	SMAD2	SMAD4	SMARCA4	SMARCB1	SMO	SNCAIP	SOC1
SOX2	SOX9	SPEN	SPOP	SRC	STAG2	STAT3	STK11	SUFU
SYK	TBX3	TEK	TET2	TGFB2	TIPARP	TNFAIP3	TNFRSF14	TP53
TSC1	TSC2	TYRO3	U2AF1	VEGFA	VHL	WHSC1 (HMMSET)	WHSC1L1	WT1
XPO1	XRCC2	ZNF217	ZNF703					

Figura 14

ALK	BCL2	BCR	BRAF	BRCA1	BRCA2	CD74	EGFR	ETV4
ETV5	ETV6	EWSR1	EZR	FGFR1	FGFR2	FGFR3	KIT	KMT2A (MLL)
MSH2	MYB	MYC	NOTCH2	NTRK1	NTRK2	NUTM1	PDGFRA	RAF1
RARA	RET	ROS1	RSPO2	SDC4	SLC34A2	TERC*	TERT (promoter only)**	
TMPRSS2								

\*TERC is non-coding RNA gene. \*\*TERT is gene with promoter region.

Figura 15

APC	AR	ATM	BRCA1	BRCA2	CCND1	CD274 (PD-L1)	CDH1	CDK4
CDK6	CDK12	CDKN2A	CHEK2	CRKL	EGFR	ERBB2	ERRF1	FGFR1
FGFR2	FOXL2	KRAS	MDM2	MET	MYC	MYCN	NF1	PALB2
PDCD1LG2 (PD-L2)		PTEN	PTPN11	RBI	SMO	STK11	TP53	VEGFA

*Figura 16*

ABL1	AKT1	ALK	ARAF	BRAF	BTK	CTNNB1	DDR2	ESR1
EZH2	FGFR3	FLT3	GNAI1	GNAQ	GNAS	HRAS	IDH1	IDH2
JAK2	JAK3	KIT	MAP2K1 (MEK1)	MAP2K2 (MEK2)	MPL	MTOR	MYD88	NPM1
NRAS	PDGFRA	PDGFRB	PIK3CA	RAF1	RET	ROS1	TERT	

*Figura 17*

ALK

EGFR

FGFR2

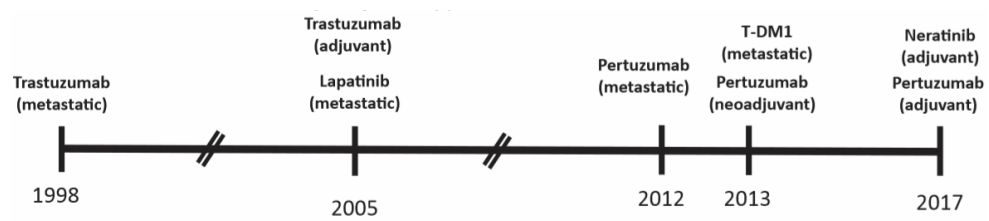
FGFR3

PDGFRA

RET

ROS1

*Figura 18*



*Figura 19*



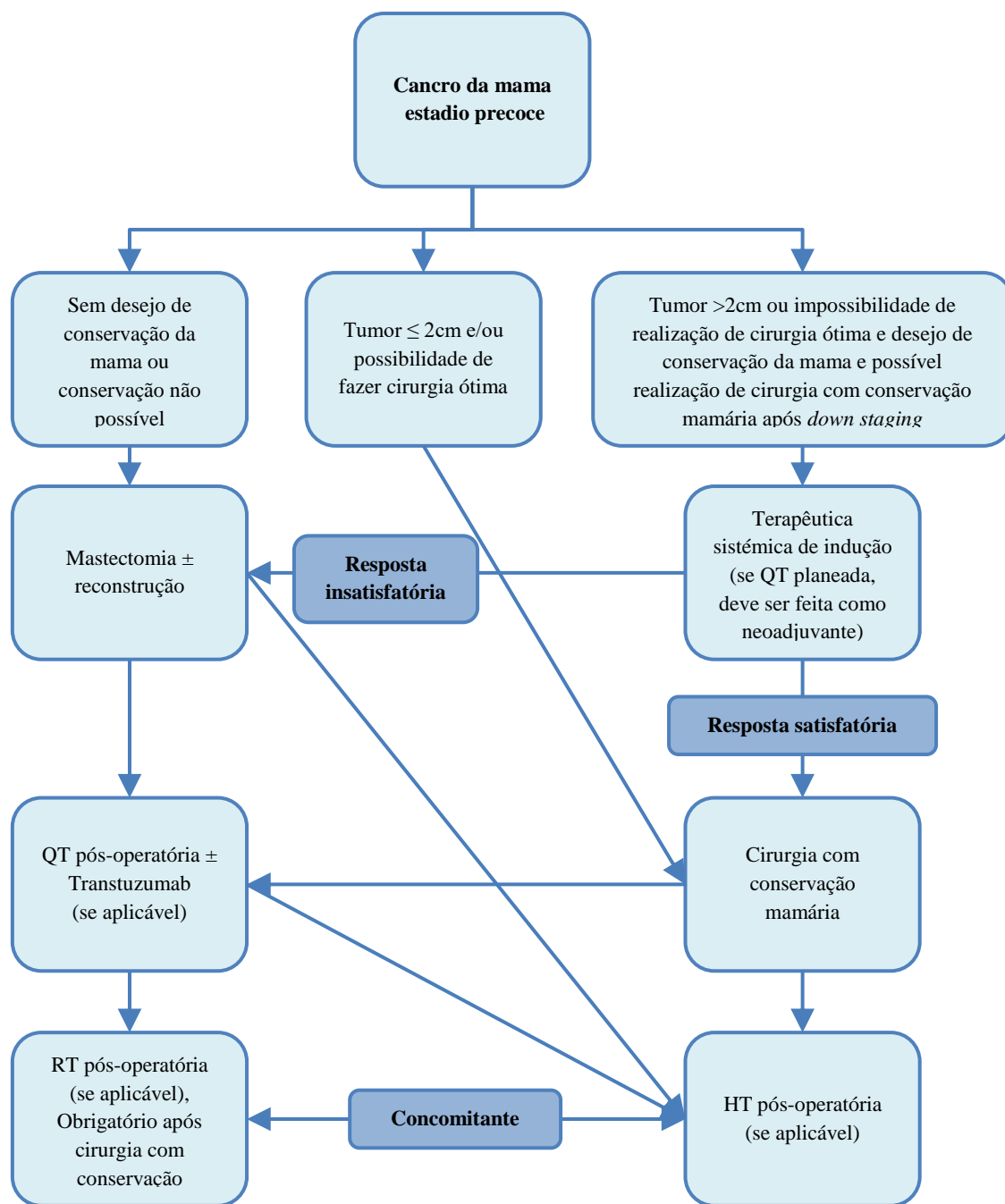


Figura 20

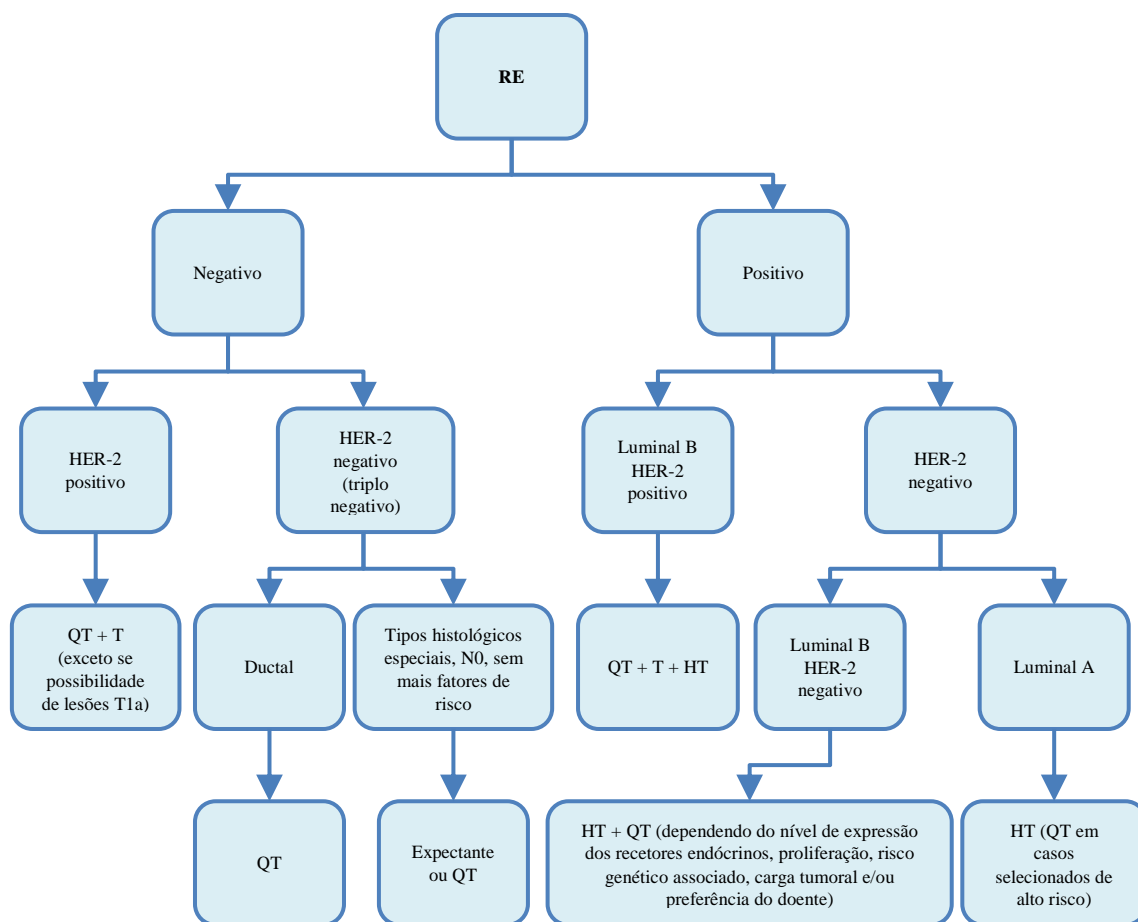


Figura 21

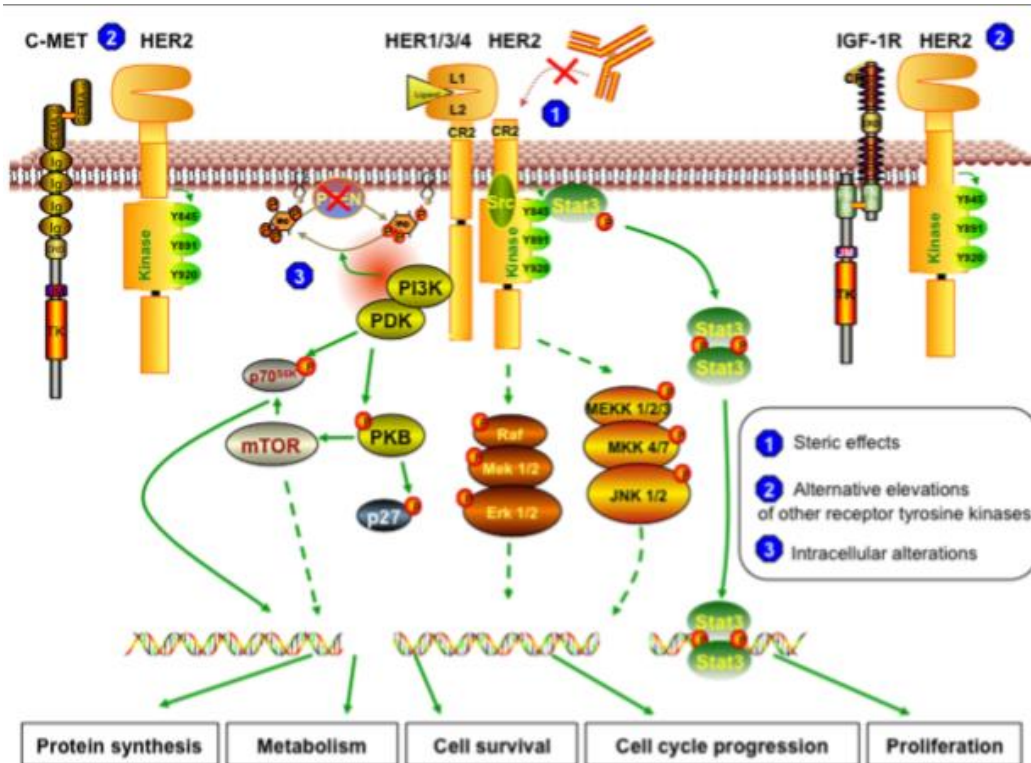


Figura 22

1	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Study of Palbociclib and Trastuzumab With or Without Letrozole in HER2-positive Metastatic Breast Cancer</a>
2	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">SYD685 vs. Physician's Choice in Participants With HER2-positive Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer</a>
3	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Palbociclib in Estrogen Receptor Positive (ER+) Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Positive (HER2+) Metastatic Breast Cancer</a>
4	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">MEN1611 With Trastuzumab (+/- Fulvestrant) in Metastatic Breast Cancer</a>
5	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">DETECT III - A Multicenter, Phase III Study to Compare Standard Therapy +/- Lapatinib in HER2-ve MBC-Patients With HER2+ve CTCs</a>
6	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Phase II Study of Pegylated Liposomal Doxorubicin (PLD) Plus Trastuzumab in HER-2 Positive Metastatic Breast Cancer</a>
7	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Detect V / CHEVENDO (Chemo vs. Endo)</a>
8	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">A Phase III Trial of Pertuzumab Retreatment in Previously Pertuzumab Treated Her2-Positive Advanced Breast Cancer</a>
9	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Atezolizumab + Pertuzumab + Trastuzumab In CNS Mets In BC</a>
10	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">MCLA-128 With Trastuzumab/Chemotherapy in HER2+ and With Endocrine Therapy in ER+ and Low HER2 Breast Cancer</a>
11	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">A Study of Pyrotinib Plus Vinorelbine in Patients With Brain Metastases From HER2-positive Metastatic Breast Cancer</a>
12	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">A Study of RC48-ADC Administered Intravenously to Patients With HER2-Positive Metastatic Breast Cancer</a>
13	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Randomized, Open Label, Clinical Study of the Targeted Therapy, Palbociclib, to Treat Metastatic Breast Cancer</a>
14	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">DS-8201a Versus T-DM1 for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-Positive, Unresectable and/or Metastatic Breast Cancer Previously Treated With Trastuzumab and Taxane [DESTINY-Breast03]</a>
15	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Neratinib +/- Fulvestrant in HER2+, ER+ Metastatic Breast Cancer</a>
16	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">FASN Inhibitor TVB-2640, Paclitaxel, and Trastuzumab in Treating Patients With HER2 Positive Advanced Breast Cancer</a>
17	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Paclitaxel, Trastuzumab, and Pertuzumab With or Without Atezolizumab in Treating Patients With Metastatic Breast Cancer</a>
18	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Anastrozole, Palbociclib, Trastuzumab and Pertuzumab in Her-positive, Her2-positive Metastatic Breast</a>
19	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Tucatinib, Palbociclib and Letrozole in Metastatic Hormone Receptor Positive and HER2-positive Breast Cancer</a>
20	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for the Treatment of HER2+ LMD</a>
23	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Letrozole, Pyrotinib Combined With SHR6390 in Patients With HR+/HER2+ Relapsed/Metastatic Breast Cancer</a>
24	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">T-DM1 and Palbociclib for Metastatic HER2 Breast Cancer</a>
25	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">S1501 Carvedilol in Preventing Cardiac Toxicity in Patients With Metastatic HER-2-Positive Breast Cancer</a>
26	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">4-1BB Agonist Monoclonal Antibody PF-05082566 With Trastuzumab Emtansine or Trastuzumab in Treating Patients With Advanced HER2-Positive Breast Cancer</a>
27	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">The AVIATOR Study: Trastuzumab and Vinorelbine With Avelumab OR Avelumab &amp; Utomilumab in Advanced HER2+ Breast Cancer</a>
28	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Whole-Brain Radiation Therapy or Stereotactic Radiosurgery With or Without Lapatinib Ditosylate in Treating Patients With Brain Metastasis From HER2-Positive Breast Cancer</a>
29	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Trial of Ibrutinib Plus Trastuzumab in HER2-amplified Metastatic Breast Cancer</a>
30	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">MRI Screening Versus SYMptom-directed Surveillance for Brain Metastases Among Patients With Triple Negative or HER2+ MBC</a>
31	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Phase I-II Study of Interferon-gamma in Patients With HER-2 Positive Breast Cancer</a>
32	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Chemotherapy Before Surgery and Tissue Sample Collection in Patients With Stage IIA-IIIC Breast Cancer</a>
33	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Neratinib and Paclitaxel With or Without Pertuzumab and Trastuzumab Before Combination Chemotherapy in Treating Patients With Metastatic or Locally Advanced Breast Cancer</a>
34	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">A Dose-Escalation Study Evaluating the Combination of Trastuzumab Emtansine (T-DM1) With Neratinib in Women With Metastatic HER2-Positive Breast Cancer</a>
35	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">PHASE II TRIAL OF THE CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR PD 0332991 IN PATIENTS WITH CANCER</a>
36	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">A Study to Allow Continued Treatment of Patients Who Have Participated in a Spectrum-Sponsored Pozotinib Study</a>

Figura 23

1	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">The p53 Breast Cancer Trial</a>
2	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Atezolizumab and Cobimetinib or Idasanutlin in Participants With Stage IV or Unresectable Recurrent Estrogen Receptor Positive Breast Cancer</a>
3	<input type="checkbox"/>	Recruiting	<a href="#">Carboplatin With or Without Atezolizumab in Treating Patients With Stage IV Triple Negative Breast Cancer</a>

*Figura 24*

1	<input type="checkbox"/>	Recruiting <a href="#">MEN1011 With Trastuzumab (+/- Fulvestrant) in Metastatic Breast Cancer</a>
2	<input type="checkbox"/>	Recruiting <a href="#">Palbociclib With Fulvestrant for Metastatic Breast Cancer After Treatment With Palbociclib and an Aromatase Inhibitor</a>
3	<input type="checkbox"/>	Recruiting <a href="#">Phase Ib Dose-escalation Trial of Taselisib (GDC-0032) in Combination With Anti-HER2 Therapies in Participants With Advanced HER2+ Breast Cancer</a>
4	<input type="checkbox"/>	Recruiting <a href="#">Circulating Dna ESR1 Gene Mutations Analysis</a>
5	<input type="checkbox"/>	Recruiting <a href="#">PI3Kbeta Inhibitor AZD8186 and Docetaxel in Treating Patients Advanced Solid Tumors With PTEN or PIK3CB Mutations That Are Metastatic or Cannot Be Removed by Surgery</a>
6	<input type="checkbox"/>	Recruiting <a href="#">Study of BYL719 (Alpelisib) in Combination With Androgen Receptor Inhibitor (Enzalutamide) in Patients With Androgen Receptor (AR)-Positive and PTEN Positive Metastatic Breast Cancer</a>
7	<input type="checkbox"/>	Recruiting <a href="#">Orteronel as Monotherapy in Patients With Metastatic Breast Cancer (MBC) That Expresses the Androgen Receptor (AR)</a>
8	<input type="checkbox"/>	Recruiting <a href="#">DETECT IV - A Study in Patients With HER2-negative Metastatic Breast Cancer and Persisting HER2-negative Circulating Tumor Cells (CTCs)</a>
9	<input type="checkbox"/>	Recruiting <a href="#">Copanlisib, Letrozole, and Palbociclib in Treating Patients With Hormone Receptor Positive HER2 Negative Stage I-IV Breast Cancer</a>
10	<input type="checkbox"/>	Recruiting <a href="#">Molecular Mechanisms of Clinical Resistance to Targeted Therapy Among Patients With Breast Cancer</a>
11	<input type="checkbox"/>	Recruiting <a href="#">A Study To Assess The Tolerability And Clinical Activity Of Gedatolisib In Combination With Palbociclib/Letrozole Or Palbociclib/Fulvestrant In Women With Metastatic Breast Cancer</a>
12	<input type="checkbox"/>	Recruiting <a href="#">An Initial Safety Study of Gedatolisib Plus PTK7-AQC for Metastatic Triple-negative Breast Cancer</a>
13	<input type="checkbox"/>	Recruiting <a href="#">A Phase III Trial of Pertuzumab Retreatment in Previously Pertuzumab Treated Her2-Positive Advanced Breast Cancer</a>
14	<input type="checkbox"/>	Recruiting <a href="#">Ipatasertib and Carboplatin With or Without Paclitaxel in Treating Patients With Metastatic Triple Negative Breast Cancer</a>
15	<input type="checkbox"/>	Recruiting <a href="#">Randomized, Open Label, Clinical Study of the Targeted Therapy, Palbociclib, to Treat Metastatic Breast Cancer</a>
16	<input type="checkbox"/>	Recruiting <a href="#">Carboplatin With or Without Atazolizumab in Treating Patients With Stage IV Triple Negative Breast Cancer</a>

Figura 25